Clinica Chirurgica Generale del R. Istituto di Studi Superiori
di Firenze - Dirett. Prof. E. BURCI

Infezioni gassogene nell' uomo

(Gangrena gassosa, edema gassoso, flemmone gassoso,
necrobiosi putrida gassosa)

Dott. GIUSEPPE D' AGATA
Libero docente di Patologia generale e speciale chirurgica

*Estratto dalla " Gazzetta Internazionale di Medicina, Chirurgia
Igiene, Interessi Professionali ,, Organo Quindicinale.
Napoli, Via Broggia 13 - 1921*

NAPOLI
Stabilimento Tipografico Fratelli Ruggiano
Vico Fico al Purgatorio ad Arco, 1
1921

Clinica Chirurgica Generale del R. Istituto di Studi Superiori
di Firenze - Dirett. Prof. E. BURCI

Infezioni gassogene nell' uomo

(Gangrena gassosa, edema gassoso, flemmone gassoso,
necrobiosi putrida gassosa)

Dott. GIUSEPPE D' AGATA
Libero docente di Patologia generale e speciale chirurgica

Estratto dalla "Gazzetta Internazionale di Medicina, Chirurgia Igiene, Interessi Professionali" Organo Quindicinale. Napoli, Via Broggia 13 - 1921

NAPOLI
Stabilimento Tipografico Fratelli Ruggiano
Vico Fico al Purgatorio ad Arco, 1
1921

Nel 1908 in individui traumatizzati, in seguito al terremoto calabro-siculo, ebbi occasione di seguire clinicamente e di studiare dal lato micro-biologico alcuni casi di infezioni gangrenose-gassose, che resi di pubblica ragione nel 1910 (1) sul « *Centralblatt f. Bakteriologie* » e in questo periodico dello stesso anno. Sotto il titolo di « *infezioni gassogene* » credetti fin d'allora opportuno raggruppare vari processi infettivi, caratterizzati dalle stesse fondamentali note anatomo-patologiche, dalla differente sintomatologia e evoluzione clinica, e dal diverso non specifico reperto batteriologico.

Stimo ancor oggi servirmi dello stesso titolo, inteso in senso lato, (termine, che recentemente hanno creduto pure di adottare vari autori: Weinberg e Séguin, Tavernier, Marwedel, Fiori ecc.), poichè serve bene a mantenere in un unico gruppo, tutta una serie di processi infettivi, presentanti come carattere fondamentale la produzione di gas nella compagine dei tessuti, in preda a varie alterazioni necrotiche o necrobiotiche; forme anatomo-cliniche, che considerate isolatamente potrebbero trovare ragione di essere catalogate sotto diverse denominazioni (come vari autori hanno creduto di fare), e che valgono nei singoli casi a mettere in rilievo quel determinato sintomo, predominante sugli altri. Così viene legittimata la denominazione di gangrena gassosa o enfisematica a quei casi, in cui localmente e inizialmente predomina il carattere necrotico in massa dei tessuti, concomitato dallo sviluppo e dalla presenza di gas; forma di edema gassoso (nel senso di Sacquépée o forma tossica, secondo Weinberg e Séguin), allorchè la manifestazione predominante, da sembrare qualche volta l'unica, è il fenomeno della infiltrazione edematosa. La denominazione di flemmone gassoso, quando la comparsa di gas fra le maglie dei tessuti più o meno alterati, è accompagnata o seguita da infiltrazione infiammatoria

suppurativa. Bisogna prendere in considerazione infine la forma anatomo-clinica di necrobiosi putrida gassosa (o varietà putride, secondo Weinberg e Séguin), allorchè le alterazioni dei tessuti a carattere necrobiotico e a chemismo putrido si sommano prevalendo sugli altri fenomeni. Naturalmente nella pratica ci è dato riscontrare una quantità di forme miste, in cui i diversi quadri anatomo-clinici si trovano insieme rappresentati.

Alle singole denominazioni delle varie forme sopraelencate possiamo far seguire un appellativo, che valga a completare tutto l' insieme nosografico, ponendo in rilievo il vario modo di presentarsi dell' infezione locale e la sua ulteriore evoluzione. Così è da distinguere secondo A. e I. Chalier (2) una forma massiva, una forma diffusa, abitualmente polisegmentaria, a tipo invadente o progressivo, e una forma circoscritta o nettamente limitata.

Per la maggioranza degli autori l' infezione gangrenogassosa è da considerare come un processo settico primitivamente locale, capace solo di generalizzarsi secondariamente e tardivamente. Alcuni studiosi però, con a capo Bingold (3), in base ai diversi reperti positivi degli esami emoculturali, eseguiti intra vitam, sostengono che l' infezione locale sia da considerare nella maggioranza dei casi come uno stadio transitorio, e che l' infezione invece divenga precocemente generale per passaggio di germi gassogeni nel circolo sanguigno e attiva moltiplicazione di essi. Scorrendo la letteratura sull' argomento si riceve l' impressione che i reperti positivi si siano solo e frequentemente avuti in una fase molto avanzata o terminale dell' infezione. (Fränkel, Frankenthal e Koenigsfeld, Taylor, Weinberg e Séguin, Lardennois e Baumel, Ramalhao).

Allo stato attuale delle nostre conoscenze credo, quindi, che sia da ritenere l' infezione gassosa come l'esponente di un' infezione locale, concomitata da una grave intossicazione generale dell' organismo (per assorbimento dei prodotti batterici o dei prodotti di autolisi settica, messi in libertà dai tessuti variamente alterati), a cui può seguire, per certi germi, quale fase terminale, una semplice batterioemia o una setticoemia, allorchè intervengono condizioni speciali di diminuita resistenza organica. (*)

(*) Riservo, solo con valore scolastico, il termine di batterioemia ai casi di semplice trasporto meccanico dei batteri nel sangue, e di setticoemia a quei casi, in cui i germi penetranti in circolo, per lo più numerosi, si moltiplicano attivamente.

Riguardo all' etiologia dell' infezioni gassogene, nel 1910, (1) riferendomi alle mie personali ricerche e a quelle degli altri, accettando la classificazione del Weichselbaum, riferita dai suoi allievi Hitschmann e Lindenthal (4), consideravo quali agenti principali dell' infezioni gassogene, tra gli anaerobi: il gruppo del bacillo di Welch-Fränkel o bac. perfringens di Veillon e Zuber e quello del bacillo dell' edema maligno di Koch-Gauffky e simili ad esso; tra gli aerobi: il gruppo del bact. coli e quello dei « proteus ».

Nel 1912 v. Werdt (5), seguendo le idee di Eugenio Fränkel, in rapporto alla distinzione clinica delle infezioni gassogene in edema gassoso maligno e gangrena gassosa (*) ritiene anche esatta la distinzione dal lato microbiologico e ammette che la prima sia data dal « bac. oedematis maligni X di v. Hibler » (anaerobio, sporigeno, mobile, putrificante; secondo v. Hibler, identificabile al bacillo dell' edema maligno di Koch) mentre la gangrena gassosa (« Gasbrand » degli autori tedeschi) possa essere provocata da vari microrganismi. Tra gli anaerobi egli enumera le seguenti specie:

1. Bacillo di Fraenkel, dall'A. riscontrato in 4 casi di gangrena gassosa e descritto nel 1893; da identificare al B. aërogenes capsulatus di Welch-Nuttall, che lo isolarono nel 1891 dagli organi spumosi del cadavere.

2. Bacillo di Ghon-Sachs I, isolato dagli AA. nel 1903 da un caso di infezione gassogena.

3. Bac. oedematis maligni II di Novy, isolato nel 1894 da una cavia, a cui era stata inoculata della nucleina del latte, e capace di riprodurre sperimentalmente una infezione gassosa.

4. Bac. VI, VII, XI del v. Hibler, isolati i primi due da infez. gassogene negli animali, e il terzo da un caso di gangrena gassosa nell'uomo.

5. Bac. pseudo-oedematis, isolato dal Liborius nel 1886 dalla terra di giardino e capace di provocare infez. gassogene negli animali. Da identificare al pseudo-bacillo dell'edema maligno, descritto dal Sanfelice.

6. Bac. di Ghon e Sachs II, riscontrato nel 1908 negli organi schiumosi di un cadavere.

(*) Se dal lato clinico la distinzione di edema gassoso e gangrena gassosa è possibile, dal lato batteriologico tale distinzione è da ritenersi non esatta, in quanto che possiamo riscontrare lo stesso microrganismo (per es: il bac. perfringens o il bac. dell'edema maligno di Koch) essere l'agente dell' una o dell'altra forma, a seconda forse del maggiore o minore grado di tossicità, di cui è fornito il ceppo in esame.

7. Bac. *enteritidis sporogenes* di Klein, isolato nel 1895 dalle feci di persone in preda a enterite acuta, e capace di produrre negli animali da esperimento delle infezioni gassogene.

8. Bac. *cadaveris sporogenes* di Klein, descritto nel 1899 come fattore della putrefazione cadaverica, e riscontrato dal v. Hibler nel 1901 in un caso di infezione gassogena umana.

9. Bac. di Markoff (ceppi D. e E.), riscontrati nel 1911 nel carbonchio sintomatico congenito dei vitelli; ceppi intermedi, secondo l'A., tra il Bac. Chauvoei e il bac. X del v. Hibler.

10. Bacillo di Stolz, isolato nel 1899 da un caso di infezione gassogena umana.

11-12. Bacilli di Nielsen (simili a quelli del carbonchio sintomatico), capaci di produrre infezioni gassogene negli animali.

Tra i germi aerobi, v. Werdt cita:

1. Bacterium coli.
2. Bac. proteus vulgaris (Hauser).
3. Bac. aerobio dell'edema maligno di Klein, da identificare al bac. aerobio del pseudoedema del Sanfelice.
4. Bac. aërogenes, aërophilus agilis, spec. nov. di Uffenheimer.

Tiberti (6) nel capitolo sulla gangrena gassosa, nel trattato di Parassitologia del Lustig, fra le specie batteriche capaci di dar luogo a questa infezione, menziona sopratutto il « Bacillus phlegmonis emphysematosae » di Fränkel.

Nel periodo bellico (.914-1918) data la grande recrudescenza di casi di infezioni gangrenose-gassogene, in seguito a ferite di guerra, spinti dal perfezionamento della tecnica microbiologica, in rapporto specialmente agli anaerobi, molti autori hanno intrapreso sistematiche ricerche sull'argomento, di modo che la letteratura sulla flora delle infezioni gassogene si è notevolmente arricchita, a scapito qualche volta della chiarezza, in quanto che specie già conosciute sono state descritte sotto denominazioni nuove.

La maggioranza degli studiosi tedeschi (Aschoff (7), Klose (8), Kolle, Sachs, Georgi (9) ecc.) cercano di raggruppare i microrganismi, capaci di provocare infezioni gassogene, in tre grandi categorie: 1.° Gruppo dei bacilli della gangrena gassosa propr. detta (Bac. del tipo Welch-Fränkel). 2.° Gruppo dei bacilli del carbonchio sintomatico (Bac. dell'edema maligno, tipo Ghon-Sachs o vibrione settico di Pasteur, Bac. di Aschoff). 3.° Gruppo dei bacilli putrificanti (Bac. dell'edema maligno, tipo v. Hibler, bac. sporogenes ecc.).

Pfeiffer e Bessau (10) raggruppano invece tali microrganismi, in due grandi categorie, a seconda della loro capacità putrefattiva. Così fra i non putrefacenti, comprendono i bacilli, tipo Welch-Fränkel (capaci di riprodurre nelle cavie la tipica gangrena gassosa nel senso di Fränkel) e i bacilli dell'edema maligno (capaci di provocare nelle cavie un tipico edema maligno nel senso di Koch, riuscendo tossici per i conigli).

Fra i putrefacenti annoverano i bacilli a lancetta di orologio e i bacilli del para-edema, germi dotati di scarsa patogenicità per gli animali da esperimento.

Anche gli autori inglesi e americani (Mc. Intosh (11), Henry (12), Adamson (13), nella classificazione dei microrganismi capaci di provocare infezioni gassogene nell'uomo, tengono conto del diverso potere proteolitico, annoverando fra quelli dotati di limitata capacità di attacco sulle albumine: il bac. aërogenes capsulatus di Welch, il vibrione settico, il bac. fallax e l'oedematiens di Weinberg e Séguin; fra quelli con spiccati caratteri proteolitici: il bac. putrificus, il bac. sporogenes, il bac. XIII di Mc. Intosh, il bac. aërofoetidus di Weinberg e Séguin.

La maggioranza dei moderni autori francesi (Weinberg e Séguin (14), Sacquépée (15), a cui si sono recentemente associati alcuni studiosi italiani (Fasiani (16), Fiori (7)), affermano che il triste primato, quali agenti delle infezioni gassogene umane, spetta principalmente a germi appartenenti ai seguenti tre gruppi: 1.° gruppo del vibrione settico, o bac. dell'edema maligno nel senso di Ghon e Sachs; 2.° gruppo del bac. perfringens; 3.° gruppo del bac. Novy (bac. oedematiens di Weinberg e Séguin, bac. bellonensis di Sacquépée, bac. Gasoedem di Aschoff).

Per Aperlo (18) figurano per frequenza in primo luogo il bac. perfringens e secondariamente il vibrione settico e il bac. coli.

Io credo che la flora delle infezioni gassogene umane debba essere così inquadrata:

Gruppo del bacillo dell'edema maligno e simili ad esso.	Bac. oedematis maligni I, nel senso di Ghon e Sachs o vibrione settico di Pasteur. Bacilli affini di Pfeiffer e Bessau, di Fiori, ecc. Bac. sarcemphysematodes hominis di Conradi e Bieling. — Bac. oedematis maligni II del Novy. (Bac. oedematiens di Weinberg e Séguin, Gasoedem bac. di Aschoff, B. bellonensis di di Sacquépée).

Gruppo del bacillo perfringens — Bac. perfringens di Veillon e Zuber, o bac. aërogenes capsulatus di Welch-Nuttall o bac. phlegmonis emphysematosae di Eug. Fränkel.

Gruppo dei bacilli putrificanti

anaerobi:
Bac. putrificus di Bienstock.
Bac. sporogenes di Metchnikoff.
(Bac. aerofoetidus di Weinberg e Séguin, bac. putr. a lancetta di orologio e bac. del paraedema di Pfeiffer e Bessau).
Bac. oedematis maligni X di v. Hibler.

—

aerobi:
Bac. lactis aërogenes di Escherich; bac. del pseudoedema di Klein e di Sanfelice; bac. aerobio settico di Legros e Lecéne).
Bact. coli.
Bac. proteus Hauseri e Zenkeri.

***

Gruppo del bacillo dell'edema maligno e b. simili ad esso.

In questo gruppo dobbiamo prima di ogni altro aggregare il bacillo, descritto sotto il nome di « *vibrione settico* » dal Pasteur (19), da lui isolato dal sangue di una vacca morta per setticemia e ben studiato in una serie di ricerche che vanno dal 1877 al 1881.

Koch (20) nel 1881 riproduceva sperimentalmente nelle cavie un'infezione che designava col nome di « edema maligno », causata da un bacillo identico al vibrione settico. Nello stesso anno Gaffky (21) precisava i risultati sperimentali ottenuti da Pasteur e Koch e adottava la denominazione di bacillo dell'edema maligno (« *Bacillus oedematis maligni,* sec. Flügge ») per il germe in esame. Brieger e Ehrlich (22) nel 1882 riportavano i primi due casi di infezioni gassogene nell'uomo, dovuti ad un microrganismo, che identificarono con il bac. oedematis maligni di Koch-Gaffky. Due anni dopo Chauveau e Arloing (23), avendo avuto occasione di studiare microbiologicamente parecchi casi di infezioni gassogene negli Ospedali di Lione, sostenevano che al vibrione settico di Pasteur dovesse essere attribuita la paternità della infez. gangrenosa-gassogena, per la quale essi vollero adottare il termine di « setticemia gangrenosa dell'uomo ». È da notare come fin da allora Rosenbach (24) sosteneva di dover comparare tale infezione

dell' uomo al carbonchio sintomatico dei bovini. Dopo la pubblicazione di Chauveau e Arloing molti casi di infezioni gassogene umane furono descritti, come dovuti al vibrione settico di Pasteur o al bacillo dello edema maligno di Koch-Gaffky (Così Braatz, Tedenat, Bremer, Verneuil, Hoeg, Giglio, Witte, Nekam, Campenon, Orion, Marchand, Forgue, Muir e Richtie). Nella maggioranza di queste pubblicazioni i dati microbiologici sono per lo più scarsi, e si rimane in dubbio, se il germe isolato debba essere senz' altro identificato al vibrione settico.

Ghon e Sachs (25) nel 1903, avendo avuto occasione di guire nel laboratorio di Weichselbaum delle sistematiche ricerche su vari batteri anaerobi, diedero una accurata descrizione del « bacillo dell' edema maligno », da loro isolato da un caso di infezione gassogena nell' uomo e che gli autori riconobbero come identico al ceppo originale del vibrione settico, esistente nell' Istituto Pasteur e inviato dal Metchnikoff a Grassberger e Schattenfroh.

V. Hibler (26) in seguito, avendo ritrovato il bacillo descritto da Ghon e Sachs in parecchi casi di infezione gassogene, volle controllare l' asserzione degli autori sopradetti, istituendo uno studio comparativo con un ceppo di « bac. oedematis maligni », proveniente dall' Istituto di Kràl. In base a tale esame comparativo, l'A. concluse per la non identificazione del bac. di Ghon e Sachs con il bac. dell' edema maligno di Koch, mentre sostenne che doveva essere identificato con quest' ultimo un germe (bac. anaerobio, mobile, sporigeno, a chemismo, putrido patogeno per gli animali da esperimento), da lui isolato dai tessuti di animali sani e dalla terra di giardino, a cui egli senz' altro diede il nome di « bac. oedematis maligni di Koch. »

Da questo momento comincia la confusione nei trattati di microbiologia, in quanto che alcuni batteriologi (Kolle e Wassermann, w. Werdt, Lehmann e Neumann, Iungano e Distaso), appoggiandosi alla autorità di V. Hibler, riportano il germe da questi descritto, (Bac. oedematis maligni X di v. Hibler) come bacillo dell'edema maligno, nel senso di Koch, identico al vibrione settico di Pasteur.

Così Fasiani (27) in una prima sua pubblicazione nel 1918, a proposito di germi anaerobi sulle gangrene gassose, attenendosi alle distinzioni di v. Hibler, e di Iungano e Distaso, considera il bacillo, descritto da von Hibler, quale corrispondente al Bacillus oedematis maligni di Koch e al Vibrion Septique degli autori francesi,

Diligenti studi hanno fatto rilevare come il bacillo di v. Hibler (non fosse altro per la capacità di provocare lesioni putride negli animali da esperimento) debba essere nettamente differenziato dal « vibrione settico » di Pasteur e verosimilmente dal bacillo dell'edema di Koch-Gaffky, il quale è da ritenere identico al vibrione settico, quantunque non possa essere istituito tra di loro un confronto, mancando il ceppo originario di Koch.

Recentemente Capone (28) pur identificando il bacillo di Ghon e Sachs al vibrione settico di Pasteur, crede differenziarlo nettamente dal bacillo dell' edema maligno di Koch, attenendosi per questo alla descrizione datane da v. Hibler.

Nel corso del lavoro, parlando senz' altro del bacillo dell'edema maligno intendiamo riferirci al germe descritto da Ghon e Sachs, come bacillo dotato di discreto pleomorfismo, anaerobio, mobile, sporigeno, resistente incompletamente al Gram, fermentatore attivo degli zuccheri e debole delle sostanze proteiche, con assenza di chemismo putrido. In anaerobiosi su agar forma colonie a tipo aperto, (*) a fiocco di ovatta, secondo gli AA. francesi.

Il latte viene coagulato lentamente, il coagulo non viene peptonizzato. Esso è normalmente patogeno per gli animali da esperimento (cavia, coniglio, topo, piccione), provocando spesso esito letale fra 24-36 ore.

Nella cavia determina, per inoculazione sottocutanea o inframuscolare, edema siero-sanguinolento gelatinoso, con scarso enfisema a piccole bolle di gas; I muscoli si presentano non rammolliti, di colorito rosso, come se fossero state immerse in una soluzione di fucsina, secondo l' immagine riportata dal Sanfelice. Alla tumefazione edematosa tiene dietro un forte abbattimento dell' animale, cui segue morte, preceduta da disturbi di respirazione, paresi e convulsioni.

Nell'essudato peritoneale e sulla superficie degli organi addominali degli animali infetti, il bacillo si presenta sotto forma di lunghi caratteristici filamenti. L'inoculazione endovenosa di circa cc. 0,5 di tossina filtrata, o meglio centrifugata, può provocare la morte della cavia

---

(*) Intendiamo per colonie a tipo aperto, quelle che si presentano costituite da ammassi più o meno irregolari, per presenza di grossolane ramificazioni o di fini intrecci filamentosi (vedi microfotografia N. I., colonia bac. sporogenes). Per colonie a tipo chiuso quelle più o meno rotondeggianti, a struttura granulosa e a contorno liscio e regolare (vedi microfotografia N. II. colonia bac. perfringens).

in pochi minuti; l' inoculazione sottocutanea dà per lo più diarrea, dimagrimento, emolisi, cui qualche volta segue morte dell'animale, in preda a profonda cachessia.

Il bacillo dell' edema maligno, quale da noi descritto, presenta senza dubbio dei punti di contatto col bac. del carbonchio sintomatico, anzi secondo E. Fränkel e Zeissler (29) questi sono tali da legittimare l' impres-
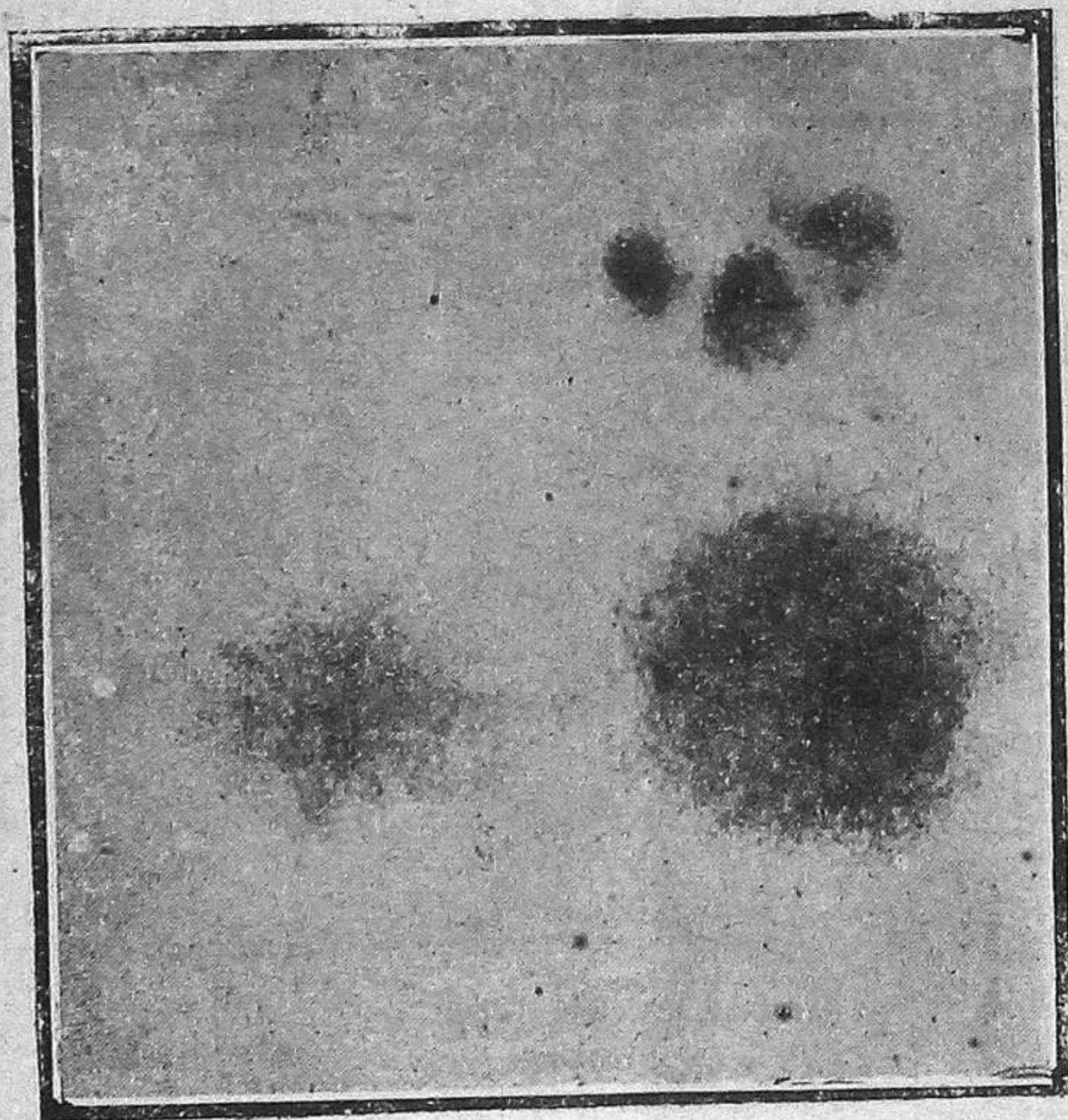
Fig. I.

sione che essi siano identici: l' unica differenza consisterebbe nella presenza di forme filamentose che il bacillo di Ghon e Sachs mostra alla superficie degli organi addominali degli animali da esperimento. L'Aschoff (7), nella sua classificazione, pone senz' altro il bacillo dello edema maligno di Ghon e Sachs nel gruppo del carbonchio sintomatico. Per i batteriologi inglesi del « *Medical Research Comittee* » (30) i due bacilli, invece, sono da tenersi nettamente separati, sia per i caratteri biochimici, sia per le reazioni biologiche.

Fiori (17) studiando parecchi casi di infezione gassosa umana ebbe occasione di isolare dei germi assimilabili al gruppo del vibrione settico di Pasteur, che presentavano caratteri tali da poterli avvicinare al gruppo del carbonchio sintomatico. Weinberg e Séguin (14), su 71 casi studiati, riportano 12 casi dovuti al classico vibrione settico. Questo figura nella statistica di Sac-

quépée il 28 %. Fasiani (27) su 32 casi lo riscontrò 8 volte.

Pfeiffer e Bessau (10), in parecchi casi di infezione gassogene per ferite di guerra, isolarono una varietà i bacilli dell'edema maligno, che si differenzierebbero, secondo gli AA., del classico vibrione settico, per il potere proteolitico più pronunziato e per la loro Gram labilità. Questi bacilli presenterebbero analogie col *bac. oedematis maligni*, Gram-negativo, descritto da Eisenberg nel
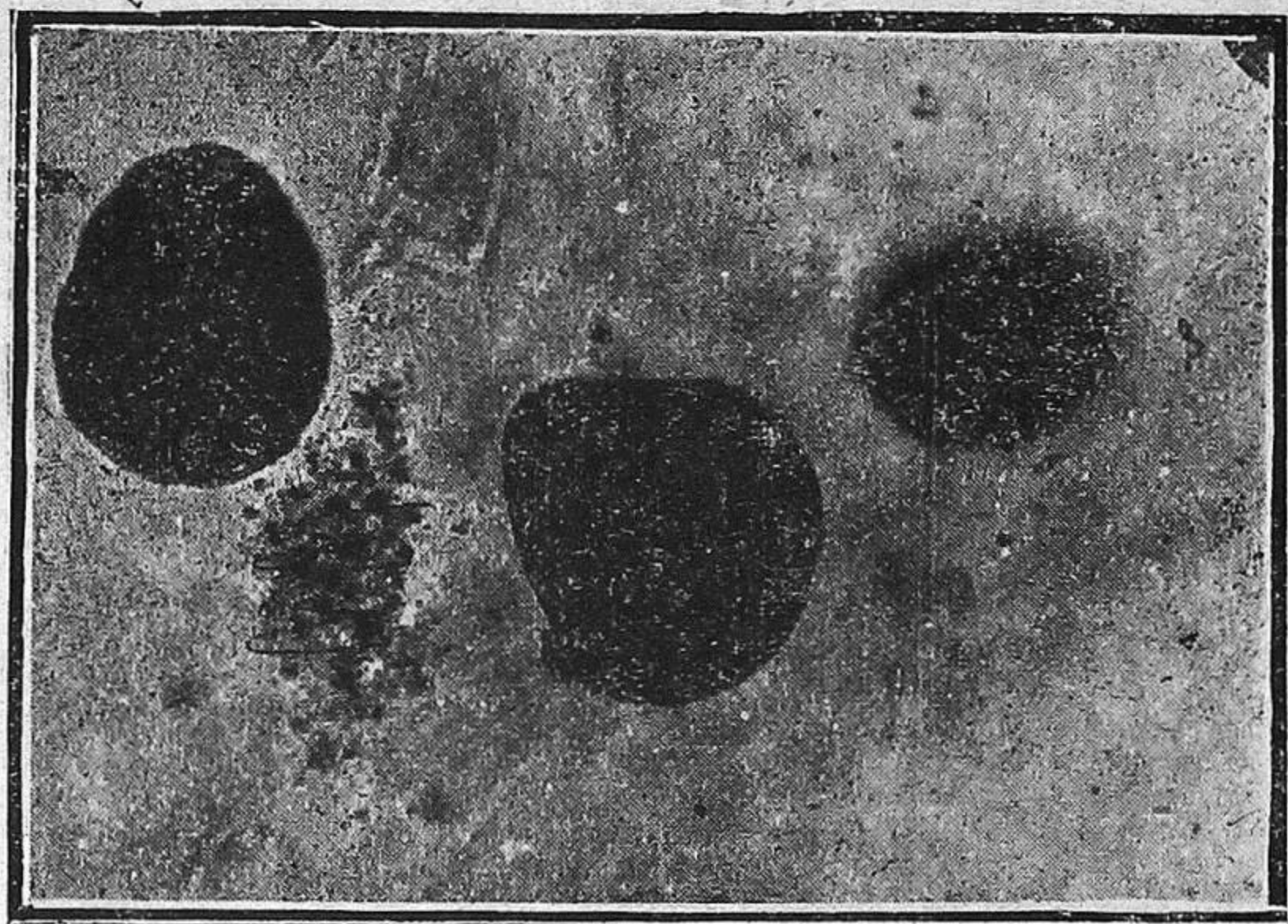
Fig. II.

1899, e poi da Fränkel nel 1915 in alcuni casi di infezioni gassogene. Quest'ultimi però manifesterebbero spiccato carattere proteolitico, a chemismo leggermente putrido. Riguardo al valore del comportamento al metodo Gram, dobbiamo far notare come alcuni autori (Ghon e Sachs, v. Hibler Freytag), abbiano messo in evidenza nei tessuti infetti, accanto ai germi Gram-positivi, appartenenti a questo gruppo, altri che non prendono il Gram. Del resto anche recentemente Zironi e Capone hanno potuto rilevare come vari anacrobi, isolati da infezioni gassogene o dall' intestino sano dell'uomo dimostrino spiccata tendenza a diventare incompletamente Gram-positivi o Gram-negativi con l' invecchiamento delle colture.

Come specie nuova di questo gruppo, Wilson (31) recentemente ha descritto sotto il nome di « *bacillus tumefaciens* » un germe anaerobio, caratterizzato da un più manifesto e esteso edema gelatinoso emorragico, di quello che si ottiene col tipico vibrione settico.

Al gruppo di bacilli dell' edema maligno, nel senso di Ghon e Sachs, crediamo avvicinare anche una cate-

goria di bacilli (il cui prototipo sarebbe rappresentato dal bac. del N o v y), i quali si differenzierebbero dal classico bacillo dell'edema maligno, oltre che per alcune reazioni biologiche (agglutinazioni, immunizzazione crociata), per qualche carattere colturale. non peculiare, e per l'assenza di filamenti sulla superficie degli organi addominali degli animali da esperimento. Quest'ultimo carattere considerato da alcuni come bastevole per farne un gruppo a sè, deve essere da solo ritenuto non sufficiente in quanto che, la mancanza di forme filamentose alla superficie degli organi addominali è stata constatata anche su tipici vibrioni settici, come W e i n b e r g e S é g u i n ebbero a mettere in evidenza in tre stipiti su dieci isolati e studiati in alcuni casi di infezioni gassogene umane, e come ha potuto osservare C a p o n e su vari stipiti provenienti dell'intestino umano.

Il « *bacillus oedematis maligni II di* N o v y », qual'è descritto dall'autore e riportato in alcuni trattati di microbiologia, isolato dal N o v y (32) nel 1894 da una cavia, alla quale era stata inoculata della nucleina del latte, è un germe anaerobio, mobile e ciliato, Gram-resistente, dotato di notevole azione fermentativa sugli zuccheri, e di debole capacità di attacco sulle sostanze proteiche.

N o v y non riuscì ad osservare sporulazione, mentre F a s i a n i asserisce di aver messo in evidenza, in alcuni stipiti isolati da individui con gangrena gassosa, la formazione di spore nei brodi al fegato dopo 48 ore di termostato. In agar glucosato ad alto strato dà in un primo tempo colonie lenticolari, capace di assumere ben presto il tipo aperto, a forma filamentosa. Viene descritto come capace di esplicare azione patogena per la cavia, coniglio, topo, producendo edema gelatinoso bianco, senza lesioni muscolari. Nel liquido peritoneale e sulla superficie dei visceri non si rinviene mai sotto forma di lunghi filamenti, come si nota nei casi da infezione da vibrione settico.

Secondo M i g u l a (33), il bacillo di N o v y dev'essere ritenuto come identico al bacillo anaerobio, riscontrato da K e r r y nello stesso anno in una vacca morta con la sindrome del carbonchio sintomatico. Per M a c é il germe in esame deve essere senz'altro considerato come una varietà del vibrione settico di P a s t e u r.

Il bacillo dell'edema maligno di N o v y conosciuto, fino a pochi anni fa, come germe non patogeno per l'uomo, è stato in questo ultimo periodo additato come agente etiologico in alcune infezioni edemo-gassogene dell'uomo. A questo germe devono essere riportati vari altri bacilli, descritti sotto diverse denominazioni, che presentano gradi di analogie tali col bacillo di N o v y, da giustificare il parere di coloro che ne sostengono la identicità. Intendo parlare dei bacilli descritti, come specie nuove,

durante il decorso periodo bellico da Weinberg e Séguin, da Sacquèpèe e da Aschoff.

Weinberg e Séguin (36) nel maggio 1915 isolavano da vari casi di infezioni gassose un bacillo, a cui diedero il nome di *bac. oedematiens*, per la spiccata facoltà di provocare negli animali da esperimento un'infiltrazione edematosa. Questo edema gelatinoso pallido è accompagnato da poco o punto gas, nel caso di stipiti tossigeni; mentre si presenta a carattere emorragico e infiltrato di gas, allorchè si adoperano stipiti virulenti. In questi casi i bacilli si rinvengono numerosi non solo in mezzo ai muscoli, ma anche nel liquido peritoneale, sui visceri addominali, mai però sotto forma filamentosa. Il bacillo oedematiens si discosterebbe dal ceppo originale del Novy per alcuni caratteri, non ritenuti essenziali, tanto che anche Weinberg e Séguin, in ulteriori pubblicazioni, affermano che il loro bacilo sia identico o estremamente vicino al bac. di Novy.

Quasi contemporaneamente ai due notati autori, Sacquépée (37) richiamava l'attenzione degli studiosi sulla frequenza di un germe, che egli aveva potuto isolare in parecchi casi di infezioni edemo gassose per ferite di guerra, e che in seguito volle distinguere sotto il nome di « *bac. bellonensis* » (antico « bacillo dell'edema gassoso maligno »). Questo germe fu oggetto di discussione in Francia, specialmente tra Sacquépée e Weinberg-Séguin, in rapporto alla loro possibile identità. La controversia fu portata all'Istituto Pasteur, ove Veillon e Loiseau (38), delegati dall'Istituto per studiare i caratteri dei due stipiti originali (forniti dai rispettivi autori), nel febbraio del 1916 emettevano il parere, che i due germi presentavano caratteri differenziali tali, da legittimare la loro distinzione. Tra questi è da ricordare la facoltà del bac. bellonensis di fornire colonie a tipo chiuso e di provocare negli animali da esperimento edema gelatinoso, leggermente roseo, con apprezzabili lesioni del tessuto muscolare.

Aschoff (39) in Germania, alla fine dello stesso anno, descriveva, come specie a sè, un bacillo, che aveva isolato da alcuni casi di infezioni gassogene a tipo edematoso, per cui aveva creduto conferire al suo germo il nome di « *Gas Oedems bacillus* », germe di poi riscontrato da Ernst Fränkel, da Ficker, da Klose. Questo si differenzierebbe dal bac. oedematiens principalmente per la forma delle colonie a tipo chiuso in agar e per la mancanza di spore del latte, secondo quando affermano Weinberg e Séguin. Il bacillo dell'edema gassoso riesce patogeno per molti animali (cavia, coniglio, ratto, topo, cavallo), provocando edema gelatinoso grigio-pallido con poca o niente produzione di gas. Pfeiffer e Bessau (l.c.) aggruppano il bac. di Aschoff tra i bacilli putridi a lancetta di oro-

logio. L'Aschoff (40) rigetta tale asserzione e sostiene che il suo bacillo sia da tenere nettamente differenziato dai bacilli putrefacenti, descritti da Pfeiffer e Bessau, in quanto che il suo bacillo è del tutto privo di carattere di putridità e inoltre riesce patogeno per gli animali da esperimento, a differenza dei bacilli a lancetta di orologio. Weinberg e Séguin credono che il bacillo dell'edema gassoso di Aschoff sia omologabile, se non identico, al loro bacillo oedematiens; mentre E. Fränkel lo raggruppa senz'altro fra i bacilli dell'edema maligno, nel senso di Ghon e Sachs.

Tutti i germi anaerobi sopra enumerati ed elencati in questo gruppo dell'edema maligno si riscontrano per lo più nelle forme anatomo-cliniche di infezioni gassogene umane, che hanno tendenza a dare infiltrazione edematosa. Il vibrione settico, in special modo, si rinviene pure non raramente in quelle altre forme, in cui prevale la necrosi dei tessuti e lo sviluppo abbondante di gas, confermando cosi un dato di fatto già assodato fin dalle prime pubblicazioni (e di cui non mancheranno esempi fra i germi degli altri gruppi), che ad un dato quadro anatomo-clinico non corrisponde sempre un determinato reperto batteriologico. Questo assume invece nella pratica valore indiscusso, in quanto che la presenza di germi di questo gruppo dell'edema maligno (quale da noi inquadrato) depone per la gravità del caso: sensibilmente maggiore, se il germe isolato corrisponde al vibrione settico o bacillo dell'edema maligno nel senso di Ghon e Sachs. specialmente se associato al bac. perfringens; relativamente meno grave (circa il 38 % di mortalità, secondo la media globale), allorchè si tratta di qualcuno dei bacilli, omologabile fra i germi dell'edema maligno di Novy.

***

Gruppo del bacillo perfringens

Il bacillo perfringens, ospite normale commensalistico dell'intestino dell'uomo e degli animali, è il microrganismo più di ogni altro ricavato, isolato e studiato nell'ultimo trentennio nella maggioranza dei casi di infezioni gangrenose-gassogene umane. Sembra sia stato per la prima volta visto nel 1884 da Rosenbach (24) sulle ferite infette, e secondo il Metchnikoff anche dal Levy e Klebs e poi da Doyen e Jamanouchi nel 1888, che lo confusero col vibrione settico. Le prime colture furono ottenute nel 1891 da Achalme (41), che lo considerò come agente del reumatismo articolare acuto. Nel 1892 veniva isolato da Welch e Nuttall (42) dal sangue e dagli organi schiumosi

di un cadavere e indicato col nome di «Bacillus aërogenes capsulatus». Eugenio Fränkel (43) l'anno seguente lo riscontrava in 4 casi di infezione gassogena umana, fornendone una dettagliata descrizione. Egli ritenendolo agente specifico del flemmone gassoso lo indicò col nome di «Bacillus phlegmonis emphysematosae».

Nel 1898 Veillon e Zuber (44), studiando gli anaerobi in diversi processi infettivi, caratterizzati specialmente da fatti gangrenosi, riscontrarono un germe, che designarono sotto il nome di «bacillus perfringens», detronizzandolo da quel carattere di specificità, che gli aveva conferito il Fränkel. Nello stesso anno, per la prima volta, in Italia riuscivano contemporaneamente ad isolarlo (senza identificarlo con specie batteriche fin allora conosciute) Cesaris De Mel (45) dal cadavere di un individuo decesso in seguito a fatti suppurativi di lunga durata all'arto inferiore destro; e a ben identificarlo col bacillo di Welch-Fränkel, Muscatello e Gangitano (46) in due casi di infezioni gangrenose-gassose degli arti inferiori. Le osservazioni in seguito andarono man mano moltiplicandosi, e mentre nel 1900 Welch (47) riusciva a raccogliere 46 casi fin allora noti nella letteratura, Simonds (48) nel 1915 faceva ascendere a 175 i casi di infezioni gassogene, dovuti a questo germe. Weinberg e Séguin su 91 casi di infezioni gassogene nella recente guerra riscontrarono 62 volte il bac. perfringens, associato ad altri germi e 8 volte in coltura pura. Così Fiori su 65 casi studiati lo rinvenne 44 volte.

Il bac. perfringens si presenta come un grosso bacillo (4 - 8 μ di lunghezza e 1 - 1,4 μ di spessore) immobile, capsulato (allorchè proviene dalle sierosità organiche), Gram-resistente, e sporigeno in condizioni speciali. In anaerobiosi su agar forma colonie rotondeggianti, lenticolari, a tipo chiuso, (per lo più a forma di «cuore giallo», secondo Weinberg), talvolta con un ciuffettino di diramazioni sottili e ineguali alla periferia. Nel latte dà rapida coagulazione, con formazione di coagulo caratteristico, cribroso, retratto. e separazione di siero chiaro. Questo germe, dotato di notevole azione fermentativa per gli idrati di carbonio (amido, destrina, glucosio, levulosio, saccarosio, maltosio, lattosio), sembra esplichi limitata e variabile capacità di attacco sulle albumine. Secondo alcuni autori (Achalme, Tissier, Metchnikoff, Pane) esso, invece, presenta la facoltà di scindere le proteine fino ai prodotti fetidi. Le colture in brodo presentano variabile potere emolitico, dimostrabile sia in vivo, che in vitro. Gli stipiti di bac. perfringens, isolati dai casi di infezioni gassogene dell'uomo, non esplicano però costantemente azione patogena; anzi, secondo alcuni, essi

sono sempre destituiti da tale facoltà, allorchè vengono a contatto con tessuti sani (Muscatello e Gangitano (49), Vincent e Stodel (50), Viscontini (51), specialmente se i germi vengono privati dalle loro tossine, per mezzo di ripetuti lavaggi e consecutive centrifugazioni (Pfeiffer e Bessau (10), De Kruif e I, Bollmann (52). Per esplicare decisa azione patogena è d'uopo che i germi pervengano in tessuti scarsamente irrorati, o variamente mortificati, sia per traumatismo, sia per cause chimiche, sia per diffusione della loro tossina, sia per agenti infettivi concomitanti; mezzi tutti, che diminuendo le proprietà difensive dell'organismo ospite, e quindi trasformando in buoni mezzi di cultura i tessuti, primitivamente non favorevoli alla pullulazione dei germi, possono permettere o provocare esplicazioni di attività patogene a ceppi, che in condizioni ordinarie non possono estrinsecare. Se isoliamo dei ceppi di bac. perfringens dalla flora dell' intestino umano, specialmente da quelli che fanno uso di alimentazione carnea (*), possiamo accorgerci come questi generalmente esplicano scarso potere patogeno, come aveva già notato il Metchnikoff, anche sperimentando su scimmie antropoidi. Sono riuscito a provocare una infezione gangrenosa-gassogena nelle cavie, allorchè inoculavo inframuscolarmente una discreta quantità di brodo coltura glucosata di 48 ore (2 3 c. c. per una cavia del peso circa di 350 gr.), causando la morte verso la 30ª ora. Inoculando con identiche modalità la stessa quantità di germi, contenuti in 2-3 cc. di brodo coltura, ma accuratamente lavati e centrifugati, e poi diluiti nella medesima quantità di soluzione fisiologica, non mi è stato dato riscontrare alcuna lesione degna di nota. Orbene, se all' iniezione di germi lavati si fa precedere l' inoculazione della loro tossina (capace di provocare da sè fatti necrotici limitati) si ottiene con una notevole percentuale un' infiltrazione gangreno-gassosa, che può condurre a morte l'ani-

---

(*) N. B. — Un metodo pratico per l'isolamento del bac. perfringens dalle feci umane è quello del Rettger, riferito e adoperato dal Metchnikoff nelle sue classiche ricerche sulla flora intestinale. Basta inseminare un pò di materiale fecale, nel latte già sterilizzato, che viene subito portato per pochi minuti a 95°-98° C. o a 80° C per 15'. Alla temperatura di 37° C, dopo 24 ore, si nota la presenza di un grumo spugnoso, da cui si separa un liquido quasi trasparente. Il bacillo perfringens si trova per lo più nella compagine del coagulo in coltura pura. Si procede all'isolamento definitivo, inseminando un pò del coagulo in tubi di agar glucosato ad alto strato o in piastre, secondo Sanfelice-Marino.

male da esperimento. Identici risultati vengono registrati allorchè si fa precedere l'inoculazione di circa c. c. 1-1,5 di brodo cultura di perfringens (dose non capace, in tali casi, di esplicare alcuna azione patogena) da una iniezione di c. c. 0,5 di soluzione di cloruro di calcio al 10 % (secondo le indicazioni di Bullock e Gramer (53); soluzione che agisce causando alterazioni necrotiche di vario grado sui tessuti, come si può controllare anche istologicamente.

Devo far notare pertanto come ceppi di bac. perfringens, destituiti da ogni potere patogeno, potevano acquistare un certo grado di virulentazione con passaggi in serie nelle cavie; mentre, d'altra parte, ceppi virulenti gradatamente divenivano inoffensivi, dopo più o meno prolungata permanenza nei comuni substrati nutritivi, anche in condizioni di stretta anaerobiosi. Se mettiamo in relazione i dati da noi riferiti, riguardanti la scarsa patogenicità (nelle condizioni ordinarie di esperimento) di ceppi di bac. perfringens, appena isolato dall' intestino, o meglio dopo lunga permanenza nei comuni substrati nutritivi, con la medesima constatazione fatta per ceppi isolati dal terreno, dagli abiti, e dalle ferite dal Lardennois e Baumel (54), da Lévy, Fourcade e Bollack (55) potremo comprendere la ragione della non frequenza delle infezioni gassogene (1,5-2 % secondo le medie riportate da Lapointe, da Franz), di fronte alla alta percentuale di reperti positivi di bac. perfringens nelle ferite, specialmente di guerra, nei vari periodi della loro evoluzione (circa il 70 %, secondo la media globale delle statistiche di Henry, Taylor, Fleming, Viscontini, Levy, Fourcade, Bollak ecc.). D'altra parte potrebbe trovare plausibile spiegazione la incostante e variabile patogenicità dei numerosi stipiti noti, isolati dai diversi casi di infezioni gassogene umane; in quanto che, allo stato di ipotesi, possiamo essere portati a considerare gli stipiti poco o nulla virulenti come provenienti direttamente o avvicinantesi al ceppo originale intestinale, per varie cause più o meno attenuato; e gli stipiti, decisamente patogeni, come rappresentanti di quelli che, allontanandosi dal ceppo di origine, abbiano trovato condizioni adatte di vita e di ambiente, per estrinsecare le loro attività biologiche, virulentandosi man mano nei successivi passaggi, da riuscire infine veramente patogenetici. Per le sopraccennate considerazioni, che scaturiscono dai dati di fatto, che son venuto succintamente ad esporre, ritengo che il bac. perfringens non sia da catalogare senz' altro fra le specie abitualmente patogene (*), come vorrebbero

---

(*) Dobbiamo far notare come una netta distinzione tra specie microbiche, patogene e saprofite, allo stato delle nostre mo-

fra gli altri Fränkel, Weinberg e Séguin, Fiori, ma sia da includere fra gli ordinari epifiti, capaci di virulentarsi e esplicare quindi azione patogenetica. Concetti che vieppiù confermano idee espresse, fin dal 1898, dal Muscatello e Gangitano (l. c.) e nel 1899 dal Westenhoeffer (56) (a cui io mi ero associato nelle mie precedenti pubblicazioni sull' argomento) e recentemente svolte e sostenute da Kolle, Ritz e Schlossberger (57), Pfeiffer e Bessau (l.c.), Taylor (58), Lardennois e Baumel (54).

Le cavie si sono mostrate gli animali più ricettivi all'infezione di perfringens e su questi animali, con ceppi virulenti, si sono potuto riprodurre tutte le lesioni osservate nell'uomo, dalla tipica gangrena gassosa alla forma edematosa, come hanno potuto mettere in evidenza Weinberg e Sèguin, con stipiti isolati dai numerosi casi di infezioni gassogene umane, da loro studiati. Iniettando fra i muscoli della coscia dei ceppi virulenti, in brodo coltura di 24-48 ore, si ottengono facilmente delle alterazioni muscolari, che trovano riscontro nelle lesioni descritte nella patologia umana. Emerge sopratutto una dissociazione delle singole fibre per edema del connettivo intere intrafascicolare. In mezzo a questo si notano accumuli di leucociti polinucleari, macrofagi, di eosinofili, e un certo numero di forme bacillari. La scomparsa delle caratteristiche striature e delle sue normali proprietà tintoriali preludia lo stato di omogeinizzazione della fibra muscolare, che in seguito appare infarcita di vacuoli e di granulazioni. I nuclei del sarcolemma, che si presentano per lo più picnotici, non scompaiono che tardivamente. A questi stadi possono, non costantemente, seguire fenomeni più o meno estesi di profonda disintegrazione della fibra stessa, come avrò occasione di accennare a proposito delle esperienze, con lo stipite isolato nella 1ª osservazione clinica. Nel tessuto cellulare sottocutaneo si possono mettere in evidenza focolai emorragici con infiltrazione leucocitaria; quest'ultima si riscontra pure intorno ai vasi, che presentano alterazioni più o meno pronunziate delle loro tuniche, come ha rilevato il Picchi (59). L'inoculazione sottocutanea di tossina, ottenuta con la centrifugazione può determinare edema molle, localizzato, senza produzione di gas, seguìto per lo più da necrosi cutanea con formazione di escara umida.

---

derne cognizioni biologiche, non sarebbe rispondente a realtà. Su tale argomento e sulla questione della virulentabilità dei saprofiti, si può consultare con profitto la recente monografia di Carbone, Quarella e Venturelli, « sui microbi saprofiti e microbi patogeni », apparsa nella « Rivista di Biologia, fasc. II e III del 1919.

L'inoculazione endomuscolare produce limitate e variabili lesioni necrotiche dei muscoli. Quella endovenosa (alla dose di 2-3 cc.) conduce a morte l'animale in poche ore, preceduta per lo più da contrazioni tonico-croniche agli arti e polipnea. L'iniezione di tossina filtrata non è sempre accompagnata da lesioni apprezzabili: di fronte ai risultati negativi ottenuti da Kamen, Tissier, Hitschmann e Lindenthal, Iungano, sono da segnalare quelli positivi registrati da Passini, Metchnikoff, Picchi, D'Agata, Korentchewsky, Weinberg e Séguin e Fiori.

Bull e Pritchett (60) asseriscono di aver ottenuto una tossina attiva, coltivando il bac. perfringens nel brodo con aggiunta di muscolo fresco sterile. Questa tossina, filtrata alla candela Berkefeld, riesce emolizzante per iniezione endovenosa, nel coniglio, nella cavia e nel piccione, e necrotizzante per iniezione intramuscolare o sottocutanea nel piccione.

Nell'uomo il bac. perfringens prevale in quelle forme anatomo-cliniche, a tipo di gangrena gassosa classica. Non raramente però questo germe si riscontra nella forma edematosa, solo o assieme al bac. fallax, o a qualche rappresentante del gruppo dell'edema maligno. Nel flemmone gassoso si trova per lo più associato a germi piogeni, e in quelle forme a carattere putrido spesso assieme allo sporogenes o altri germi del gruppo dei putrificanti. I ceppi isolati dai diversi casi dimostrano, tanto nell' uomo che negli animali ricettivi, variabile virulenza. La media globale della mortalità nelle infezioni gassogene umane, dovute al bac. perfringens, si aggira dal 25 al 35 %.

Per le considerazioni avanti esposte, in rapporto alla prognosi è da conferire sopratutto valore al risultato delle prove biologiche (e tra queste, alla diretta inoculazione endoperitoneale negli animali ricettivi, come consiglia Fiori), non tralasciando di sperimentare anche con gli altri germi concomitanti, aerobi o anaerobi, che per lo più riescono ad aggravare il decorso dell'infezione. Potranno essere così forniti al pratico dei dati, che valgano ad orientarlo per una ben diretta e energica azione terapeutica.

*
* *

In appendice a questo capitolo deve aggiungere qualche dato sul *bacillus fallax*, isolato nel 1915 da Weinberg e Séguin (61), che credettero farne una specie a sè, non omologabile con alcuna dei gruppi precedenti, sopratutto per i risultati negativi ottenuti con le prove biologiche (agglutinazione e neutralizzazione), espletate col vibrione settico, col bac. oedematiens e col bac. perfringens.

Il germe in esame è un anaerobio, che si presenta sotto forma bacillare, più sottile del bac. perfringens, per lo più capsulato, abitualmente asporigeno, ciliato e Gram resistente nelle colture giovani. In agar glucosato ad alto strato da colonie a tipo chiuso, a cuore giallo o ovali, talvolta provviste di corti filamenti, con sviluppo abbondante di gas. Attivo fermentatore degli zuccheri, è dotato di scarso o punto potere proteolitico. Discretamente patogeno per la cavia e per il topo, provoca sottocutaneamente edema gelatinoso, di colorito rossastro, infiltrato di gas, con lievi alterazioni muscolari. La tossina solubile (alla dose di cc. 1-2) per iniezioni endovenosa uccide la cavia, e per via sottocutanea, a dosi più forte, riproduce l'edema. Questo germe è stato da alcuni autori omologato ai bac. VI e VII di v. Hibler (62) e al bacillo dell'enfisema maligno, descritto da Stolz nel 1902 (63).

Meno differenziato dal precedente è il *bac. lyticus*, descritto nel 1915 da Costa e Troisier (64), come rappresentante di un gruppo di bacilli, intermedi fra il bac. perfringens e il vibrione settico. Si tratta di bacilli anaerobi (isolati da vari casi di infezioni gassogene umane per ferite da guerra), che, nella cavia provocherebbero (per iniezione sottocutanea o inframuscolare) edema gelatinoso, emorragico, con sviluppo di gas e miolisi. Questi bacilli attivi fermentatori degli zuccheri e delle sostanze proteiche presenterebbero da una parte dei caratteri morfologici (mobilità, spore) che li collegano al gruppo del vibrione settico e dall'altra, dei caratteri culturali (colonie e tipo chiuso, produzione abbondante di gas) che li avvicinano al gruppo del bac. perfringens. Gli A. A. non hanno neppure espletato le reazioni biologiche, per confortare la loro asserzione sulla reale esistenza di tale gruppo, intermedio fra il bac. perfringens e il bac. dell'edema maligno, nel senso di Ghon e Sachs.

Un altro germe, che non ha trovato una sistematizzazione microbiologica è il «*bac. Sarcemphysematodes hominis*» descritto da Conradi e Bieling (65) nel gennaio 1916; germe anaerobio, che — secondo gli autori — rappresenterebbe il tipo umano del bacillo del carbonchio sintomatico. In successive pubblicazioni gl' A. A. emisero l'ipotesi, che il loro bacillo sia una specie estremamente poliforma, capace di subire delle modificazioni essenziali nei suoi caratteri micro-biologici, da giustificare la formazione di due tipi estremi: tipo A con i caratteri del bacillo perfringens e tipo B con quelli del bac. dell'edema maligno nel senso di v. Hibler, e una quantità di tipi intermedi, che rappresenterebbero vari stadi del processo di trasformazione del «bac. sarcemphysematodes hominis». In rapporto a questa pretesa trasformazione Fasia-

ni (66), che ha controllato le ricerche di Conradi e Bieling, sperimentando con vari stipiti di bac. perfringens e di germi del gruppo dell' edema maligno di Ghon e Sachs, di Novy e del gruppo dei putrificanti, sporigeni, non ha potuto mai riscontrare una modificazione dei caratteri morfologici e biologici dei singoli stipiti, per effetto della coltivazione unica o ripetuta in muscolo umano, nè del passaggio in serie in substrati zuccherati o in substrati di albumina, nè in seguito all'inoculazione nell'animale da esperimento. Il bac. sarcemphysematodes del Conradi e Bieling, confermato dalle ricerche di alcuni autori (Fuerth, Mc Intosh), è stato da altri (Weinberg e Séguin, Fränkel) accolto con diffidenza, in quanto che viene sollevato il dubbio che le osservazioni di Conradi e Bieling non siano state compiute su materiale puro. Necessitano ad ogni modo ulteriori studi per l'identificazione del germe e per la presunta sua importanza nell'infezioni gassogene.

***

Gruppo dei bacilli putrificanti

Fanno principalmente parte di questo gruppo alcuni germi anaerobi, mobili, sporigeni, Gram-positivi, dotati di variabile, per lo più scarsa, attività fermentativa sugli idrati di carbonio, capaci invece di attaccare profondamente la molecola di albumina e di scinderla fino ai prodotti putridi. Prototipo di questo gruppo è il *bac. putrificus*, considerato da alcuni autori (Aschoff (40), Kolle, Sachs, Georgi (9) come rappresentante apatogeno del gruppo. Isolato nel 1884 da Bienstock (67) dal materiale fecale umano, e studiato in seguito da Tissier, Martelly e da Rettger, è stato dal Klein (68) nel 1899 isolato dal fegato e dalla milza d'un cadavere, e ritenendolo come specie a sè, designato col nome di « Bac. cadaveris sporogenes. » In casi di infezioni gassogene umane è stato riscontrato nel 1901 da v. Hibler, nel 1908 e nel 1911 da Rocchi (69) e recentemente da Klose (8) e da Fasiani (27). Sacquépée afferma di aver avuto occasione di poterlo mettere in evidenza nell'11 % dei casi studiati. Un altro germe di questo gruppo, riscontrato più frequentemente del precedente, in parecchi casi di infezioni gassogene umane (il 21 % secondo Sacquépée) è il *bac. sporogenes* di Metchnikoff (70), ritenuto da Klein (71) quale agente dell'enterite acuta e quindi designato col no-

me di «bac. enteritidis sporogenes». E' un germe anaerobio, mobile, sporigeno, resistente al Gram, morfologicamente simile al bacillo dell'edema maligno, tale da essere ritenuto da alcuni (Tissier) come una varietà attenuata del vibrione settico, opinione espressa recentemente da Sacquépée, non condivisa invece da Weinberg e Sèguin, che che lo considerano come specie a sè. In agar glucosato, come il bacillo dell'edema maligno, forma colonie a tipo aperto, filamentoso. Attacca la maggior parte degli idrati di carbonio con minore attività del vibriono settico, e a differenza di questo è senza azione sull'amido, sul saccarosio, sulla mannite. Possiede spiccata attività proteolitica, decomponendo energicamente l'albumina, con formazione di ammoniaca, basi aminiche, tirosina, fenolo, indolo, scatolo ecc. I ceppi, isolati dall'intestino umano, si presentano destituiti da ogni patogenicità. mentre alcuni di quelli isolati dai casi di infezione gassosa, si sono mostrati variamente virulenti. Weinberg e Séguin (72), che hanno avuto occasione di riscontrare nell'infezioni gassogene umane, il bac. sporogenes di Metchnikoff, 34 volte su 126 casi studiati, affermano di aver isolato anche degli stipiti virulenti, patogeni per gli animali da esperimento. Gli A. A. hanno potuto riprodurre sperimentalmente la forma putrida di infezione gassogena, inoculando fra i muscoli da 3 a 5 c. c. di coltura in brodo glucosato di uno stipite virulento di bac. sporogenes. La lesione rimaneva localizzata nel punto di inoculazione, volgendo spesso a guarigione e conducendo qualche volta a morte l'animale in 24-36 ore. Il tessuto muscolare si presentava in preda a gravi fatti distruttivi e disseminato di gas. Iniettando la tossina, filtrata alla candela Chamberland, gli A. A. affermano di aver potuto assistere alla morte dell'animale, sia con l'inoculazione endovenosa, che per via sottocutanea. Un ceppo da me riscontrato in un caso di necrobiosi gassosa putrida, presentava discreta patogenicità, appena isolato dal focolaio settico, in quanto che potei riprodurre sperimentalmente il quadro anatomo-clinico, con l'inoculazione di c. c. 1,5 di brodo-cultura Martin di 48 ore. Sulle intime alterazioni muscolari, che ho potuto mettere in evidenza, tanto nelle lesioni umane, che in quelle sperimentali con il ceppo di bac. sporogenes isolato, dirò in una nota a parte e in un capitolo di questo lavoro, riferendo il caso clinico venuto alla mia osservazione. Il germe si è attenuato nei successivi passaggi sui comuni substrati nutritivi, dopo sei mesi, anche iniettato a dosi generose (3-4 c.c.) dava luogo solo ad una infiltrazione, localizzata al punto di inoculazione formando qualche volta un'escara cutanea, tumefazione, che generalmente scompariva dopo alcuni giorni. Manifeste lesioni gangreno-gassose putride potei invece riprodurre, allorchè facevo precedere l'inoculazione endomu-

scolare della coltura con l'iniezione di qualche c.c. di soluzione di cloruro di calcio al 10 %, come avevo sperimentato con ceppi poco virulenti di bac. perfringens, e di cui ho fatto cenno in uno dei capit. precedenti. Sulla virulentazione dei germi putridi delle infezioni gassogene ha anche recentemente riferito Fiori, sperimentando con ascite o bile-coltura, o meglio inoculando il brodo coltura con l'aggiunta di filtrati di liquidi patologici.

Da avvicinare al bac. sporogenes di Metchnikoff è il *bac. histolitycus*, isolato da Weinberg e Séguin (73) in parecchi casi di infezioni gassogene umane e descritto in seguito da Legros e Vaucher (74), Mc. Intosh (11) e Ramalhao (75). Questo bacillo, si differenzierebbe dai germi di questo gruppo sopratutto per l'assenza di produzione di gas e di chemismo putrido, tanto nei terreni culturali, che nelle lesioni anatomo-patologiche. Dei ceppi conosciuti, alcuni si sono mostrati privi di ogni carattere patogenetico, altri si sono mostrati capaci di provocare negli animali recettivi (cavia, coniglio, topo) profonde lesioni distruttive dei tessuti molli, tali da mettere a nudo le parti scheletriche sottostanti. La tossina, ottenuta con la centrifugazione, inoculata sottocutaneamente o intramuscolarmente, è capace di provocare edema emorragico, con manifeste lesioni distruttive. Weinberg e Séguin assegnano una certa importanza al bac. histolyticus, come germe concomitante, in quanto che provoca delle alterazioni dei tessuti, che riescono particolarmente favorevoli ad altre specie patogene. Lo stesso può dirsi del bac. *aërofoetidus*, isolato e descritto pure da Weinberg e Séguin (76). Si differenzia dai precedenti, per la sua scarsa mobilità, per la mancanza di produzione di spore e per le forme delle colonie a tipo chiuso, talvolta provviste di brevi filamenti. Possiede notevole attività fermentativa sugli zuccheri e attacca le sostanze proteiche, fino ai prodotti fetidi. Questo germe si mostra debolmente patogeno per la cavia; l'iniezione endomuscolare di brodo-cultura provoca edema gelatinoso, pallido, con scarse lesioni muscolari a carattere leggermente putrido. Altri germi, che si possono avvicinare allo sporogenes di Metchnikoff, sono (secondo gli autori francesi) i bacilli putrificanti a lancetta di orologio — *Uhrzeigebazillen* — descritti da Pfeiffer e Bessau (10). Questi autori hanno descritto pure fra i germi putrificanti, i bacilli del para-edema -- *Paraödembazillen* —, che si differenzierebbero dai precedenti, perchè dotati di minore mobilità, di minore facilità a produrre spore e di più scarso potere proteolitico, quantunque a chemismo decisamente putrido. In questo gruppo di germi anaerobi sporigeni, putrificanti, io credo debba esser catalogato il *bac.*

oedematis maligni X di V. Hibler (26), che pur presentando molti caratteri comuni col bac. dell'edema maligno di Koch e col vibrione settico (e perciò dall'A. identificato a questi), deve essere da essi nettamente differenziato, non fosse altro per la spiccata sua capacità a provocare lesioni anatomo-patologiche, a carattere putrido. E' da rilevare, come Weinberg e Séguin, abbiano anche elevato dei dubbi sulla reale esistenza di questa specie; essi sono propensi a credere che si trattasse di coltura impura di vibrione settico con qualche germe putrificante, come fu agevole di constatare a loro in una cultura, ritenuta pura di bac. X di v. Hibler, isolato da Miss Robertson, da un caso di gangrena gassosa umana. Al sopradetto bac. di v. Hibler, sarebbe da avvicinare il bacillo isolato e descritto da Wicklein (77) nel 1891 in tre casi di infezioni gassogene umane e il bacillo XI di v. Hibler, che si differenzia dal bac. X per la minore patogenicità e per la mancanza di forme filamentose alla superficie dei visceri.

I sopradetti germi anaerobi, appartenenti al gruppo dei bacilli putrificanti, si riscontrano nelle infezioni gassogene umane, con una certa frequenza associati a germi anaerobi dei due gruppi precedenti, conferendo in tal caso al processo morboso, quale speciale impronta, il carattere della putridità. Non raramente però questi germi si rinvengono nei tessuti invasi dall' infezione gangreno - gassogena (e qualche volta anche nel sangue circolante, dove Klose (78) li ha isolati 29 volte su 80 casi osservati), quale specie unica microbica (*casi di Weinberg e Séguin, Fasiani, D'Agata*), facendo ritenere molto probabile che essi siano capaci di provocare in tessuti primitivamente lesi nella loro vitalità, per cause svariate, un processo necrobiotico putrido gassoso. Fatti, che io ho avuto anche occasione di poter confermare con dati sperimentali: producendo infatti, nei muscoli della coscia delle cavie, delle lesioni necrotiche, per mezzo di traumatismi, o con soluzioni di sostanze chimiche ($CaCl^2$ al 10 $^0/_0$), ho potuto, con inoculazione di bac. sporogenes non virulento, riprodurre delle alterazioni gangrenose gassogene, a carattere putrido; alcune volte così estese, da portare alla distruzione delle parti molli, tali da mettere completamente a nudo lo scheletro sottostante. Eliminati man mano i tessuti distrutti e putridi, per opera delle parti molli circostanti, seguiva per lo più riparazione e completa guarigione. Fatto simile a quello che si rileva nell' infezioni gassogene umane, dovute a germi putrificanti e in cui un'economica exeresi delle parti invase dalla distruzione gangrenosa-putrida, basta a dominare il processo settico (vedi osservazione clinica II). Il reperto batteriologico quindi assurge

anche qui all' importanza di non trascurabile elemento di prognosi, in quanto che la presenza di soli germi anaerobi putrificanti è indice di benignità del processo, così com'è nel caso, che l' infezione gassogena sia dovuta a soli germi aerobi. Tra questi è da notare, come capaci — in special condizioni — di dare delle manifestazioni gangrenose-gassogene, il *bacterium coli*, quantunque nel recente periodo bellico, per quanto io sappia, non siano stati descritti casi di infezioni gassogene dovuti a tale microrganismo. Le pubblicazioni antecedenti però di autori degni di fede (Chiari, v. Dungern, Bunge, Grassberger, Umber, Hitschmann e Lindenthal, Dudgeon e Sargent all'estero; Mergarucci, Muscatello, Donati e Uffreduzzi, Rizzo, Stinelli in Italia) ci ammoniscono della possibilità di tale evenienza, come io stesso potei dimostrare nel 1908 in un caso di infezione gassogena, in un traumatizzato dal terremoto calabro-siculo. Muscatello (l. c.) ritiene che si tratti sempre di una varietà di bacter. coli, del « *bac. lactis aërogenes di* Escherich » (79), dotato di potere gassogeno, potere che esso può acquistare molto probabilmente nella simbiosi con altri microrganismi e che perde rapidamente quando viene coltivato sui terreni nutritivi artificiali. Così è da riportare ad una varietà di bact. coli, il bacillo descritto dal Klein (80) nel 1891, come nuovo bacillo dell'edema maligno, e nello stesso anno dal Sanfelice (81), che diede il nome di « *bacillo del pseudoedema* ». Nel 1897 Chavigny (82) riscontrò tale germe in un caso mortale di gangrena gassosa nell' uomo, e Welch (83) nel 1900 asserisce di aver isolato un bacillo simile in parecchi casi di infezioni gassogene umane.

Fra gli altri germi aerobi, descritti nel periodo antebellico, capace di dare infezioni gassogene sono da ricordare il *bac. aërogenes aerophilus agilis di* Uffenheimer (84), isolato nel 1901 da un caso di infezione gassosa, assieme a stafilococchi e streptococchi piogeni, il « *bacillus aërogenes necrosans* » riscontrato da Schupfer (85) da un ascesso gassoso della regione sottoclavicolare e il *bacillo aerobio settico*, isolato nello stesso anno da Legros e Lécene (86) in un caso mortale di gangrena gassosa e poi riscontrato nel 1904 da Iacobelli (87), e nel 1906 da Anzillotti (88) e da De Gaetano (89). Questo ultimo autore potè riprodurre sperimentalmente il quadro della infezione gangreno-gassosa putrida, come avevano riferito pure Legros e Lecéne, usando l'artificio di tecnica, di aggiungere alla coltura del bacillo settico aerobio alcune goccie di una soluzione di acido lattico. Secondo Macé (35) il bac. aerobico settico di Legros-Lecéne deve essere riavvicinato al gruppo del bact. coli.

Riguardo ai « *Proteus* » ritenuti da Hauser (90) come appartenenti ai « bacilli putrificanti più attivi e più sparsi in natura », è da ricordare sopratutto i reperti di Grassberger e Widal (91), che rilevarono tali germi in parecchi casi di infezioni gassogene. Così, nella recente guerra, Sacquépée (92) afferma di avere riscontrato quale flora di passaggio dei germi appartenenti ai proteus. Lannerlongue e Achard (93) hanno potuto riprodurre negli animali da esperimento delle infezioni gangrenose-gassogene; ed io (94), nel 1909, con l'inoculazione di due ceppi (« *proteus vulgaris* e *proteus* tipo Zenkeri »), insieme isolati da un caso di gangrena gassosa a carattere putrido, per ferita d'arma da fuoco, riuscii a provocare nel sottocutaneo delle cavie degli edemi, accompagnati da lesioni necrotiche putride e sviluppo di gas. Anche recentemente Sacquépée, De Lavergne e Dehorne (95) hanno riferito di avere ottenuto sperimentalmente degli edemi gelatiniformi emorragici, con l'inoculazione sottocutanea di diversi ceppi di « proteus », isolati da ferite di guerra. Questi bacilli d'altra parte (capaci da per sè di esaltare la virulenza di germi attenuati, come dimostrano le esperienze di A. Monti (96)), possono riscontrarsi nel focolaio settico, quali germi concomitanti o favorenti il processo infettivo. Ricordo di aver potuto riprodurre delle alterazioni gangrenose a carattere putrido e sviluppo di gas, inoculando inframuscolarmente nelle cavie del brodo cultura di bac. sporogenes e di proteus vulgaris, germi isolatamente dotati di assai scarsa patogenicità.

Scorrendo la letteratura sulla flora batterica delle infezioni gassogene, specialmente dell'ultimo periodo bellico, si constata come eccezionalmente sul focolaio settico siano stati isolati soli germi aerobi; Weinberg e Séguin su 126 casi studiati batteriologicamente trovarono soltanto sei volte germi aerobi in coltura pura, così Fiori 3 volte su 69 casi. Gli aerobi in generale si riscontrano, invece, con frequenza associati ai germi anaerobi, specialmente a bacilli appartenenti al gruppo dell'edema maligno o a quello del bac. perfringens. L'importanza e il valore di tale associazione microbica nelle infezioni gassogene è ancora oggetto di discussione. Tissier (97) crede conferire a tale associazione aero-anaerobica una considerevole importanza, poichè — secondo l'Autore — gli aerobi non solo favorirebbero la virulentazione degli anaerobi associati, ma sarebbero sopratutto necessari per preparare nei tessuti modificazioni essenziali per la vita e lo sviluppo degli anaerobi gassogeni. In contrapposto a tale concezione, Margouliès-Aitoff e Brallowskj (98) affermano che l'infezione gassogena si presenta altrettanto meno grave, quanto in maggiore quantità si trovano i germi

aerobi associati. Senza volere completamente contraddire i dati di fatto esposti da questi ultimi Autori, nè accettare l'assolutismo di Tissier, credo che in caso di associazioni aero-anaerobiche sia poco prudente generalizzare, potendo verificarsi, per condizioni varie di esperimento, fenomeni diversi sia di inter-azione, sia di inter-inibizione.

In base alla mia esperienza clinica e di laboratorio, mi sento autorizzato a ritenere, che in molti casi gli aerobi, mentre da una parte agevolano la pullulazione degli anaerobi e l'esplicazione delle loro proprietà bio-patogenetiche, dall'altra possono essere favoriti dall'associato e giungere a dominare insieme la sindrome fenomenologica, irrompendo poi da soli, in qualche caso, nel circolo sanguigno, come starebbero a dimostrare le streptococciemie, che si riscontrano quali non rare e gravi complicazioni nelle infezioni gassogene; reperto, che io ho potuto registrare in uno dei casi clinici studiati e che tosto riferirò.

*
* *

Osservazione I. — D'E... Cono, di a. 32, sold. del 136.° Fanteria. Venne ferito dallo scoppio di una granata il 7 agosto 1915, a Monte Sei Busi, riportando frattura esposta del femore sinistro. Medicato in una sezione di sanità e ricoverato per 4 giorni in un Ospedaletto da Campo, giunse nel Reparto Militare della R. Clinica Chirurgica di Firenze il 13 agosto, dopo sei giorni dal subìto traumatismo. Si constatava frattura comminuta esposta del femore sinistro, nel suo terzo medio, con spappolamento delle parti molli nella regione latero-esterna della coscia. Questa si presentava aumentata di volume, edematosa, lasciando percepire non nettamente un senso di crepitazione; la cute era tesa, lucente, come marmorizzata per la presenza di marezzature bluastre. Comprimendo sui contorni della ferita, fuoriusciva del liquame, lievemente emorragico, fetido, non putrido, commisto a poche bollicine di gas. Le condizioni generali erano discrete: temperatura 38 5; polso 96, valido e regolare. Colorito della pelle sub-itterico. Tracce di albumina nelle orine. Immediatamente si procedette ad ampi sbrigliamenti delle parti molli della coscia e all'exeresi delle parti gangrenate, e tra queste, a porzioni di tessuto muscolare e a sequestri di osso necrosato. Contemporaneamente venne estratta una grossa scheggia di granata. Dall'essudato e dai pezzi di tessuto necrotico vennero praticate delle colture aerobiche ed anaerobiche. Nei mezzi aerobici si sviluppò uno streptococco, negli anaerobici un bacillo gassogeno, im-

mobile, Gram-positivo. L'emocultura diede risultato negativo. L'ampia breccia fu sempre trattata con abbondante irrigazione di acqua ossigenata, e secondo le indicazioni di Delorme furono pure eseguite una doppia corona di iniezioni di acqua ossigenata alla radice della coscia. Il processo settico locale fu così ben presto dominato, migliorando di pari passo le condizioni generali. Dopo un mese però, pur persistendo discrete le condizioni locali, si ripresentò la temperatura alta, il polso frequente, accompagnata da sub-delirio e grave prostrazione dell' infermo. Dal focolaio locale vennero isolati lo streptococco e l' anaerobio gassogeno, come prima. Dal sangue si ebbe sviluppo di uno streptococco in cultura pura. Furono praticate delle iniezioni endovenose di siero antistreptococcico e d'argento colloidale, cercando di tenere dominato sempre il processo settico locale.

Dopo una quindicina di giorni le condizioni generali andarono man mano migliorando, persistendo solo una lieve albuminuria per circa 40 giorni. L' ampia breccia chirurgica, al terzo esterno della coscia, si ricopriva di buone granulazioni, e il 20 ottobre l' infermo veniva traslocato in altro Ospedale, in via di avanzata guarigione, con stabile consolidamento della frattura femorale.

Ricerche microbiologiche — L' esame microscopico degli strisci eseguiti con materiale prelevato dal focolaio settico dimostrò, in mezzo a detrimenti cellulari e leucociti, in preda ad avanzata degenerazione, delle forme streptococciche e dei bacilli, isolati o riuniti a coppie, Gram-resistenti, circondati da una formazione ad alone, allorchè venivano osservati dei preparati montati in acqua. Le culture furono eseguite in mezzi aerobici ed anaerobici, valendomi per quest' ultimi dell' agar glucosato ad alto strato, del metodo Tarozzi-Grixoni e delle piastre secondo Sanfelice-Marino. Con questi mezzi sono riuscito ad isolare un germe anaerobico, che morfologicamente si presenta sotto forma di grossi bastoncini (di circa 4-6 μ per 1 μ), immobile, con estremità leggermente arrotondate. Questo bacillo si colora facilmente e resiste alla decolorazione col metodo Gram. Normalmente si presenta asporigeno; dà luogo a spore incostantemente nel mezzo consigliato da Achalme, cioè in soluzione fisiologica con bianco d' uovo, o meglio in coltura in latte diluito a metà, dove era stato aggiunto un pezzo di fegato sterile di coniglio e del carbonato di calcio, secondo le indicazioni di Pane (99).

In brodo comune dà intorbidamento, seguìto da precoce flocculazione del mezzo e odore di acido butirrico.

In brodo Tarozzi-Grixoni il germe si sviluppa abbondantemente, con forte e uniforme intorbidamento del

mezzo nutritivo, con produzione di gas fetido, non putrido, mentre il frammento del fegato si presenta galleggiante. In brodo con l'aggiunta del 2,5 % di amido polverato inglese, secondo le indicazioni di Pane-Lorenti, si ha rigoglioso sviluppo, come sopra. Nelle patate cresce male, e dà soltanto dopo vari giorni una leggera patina, debolmente grigiastra. Nell'agar si ha sviluppo di colonie
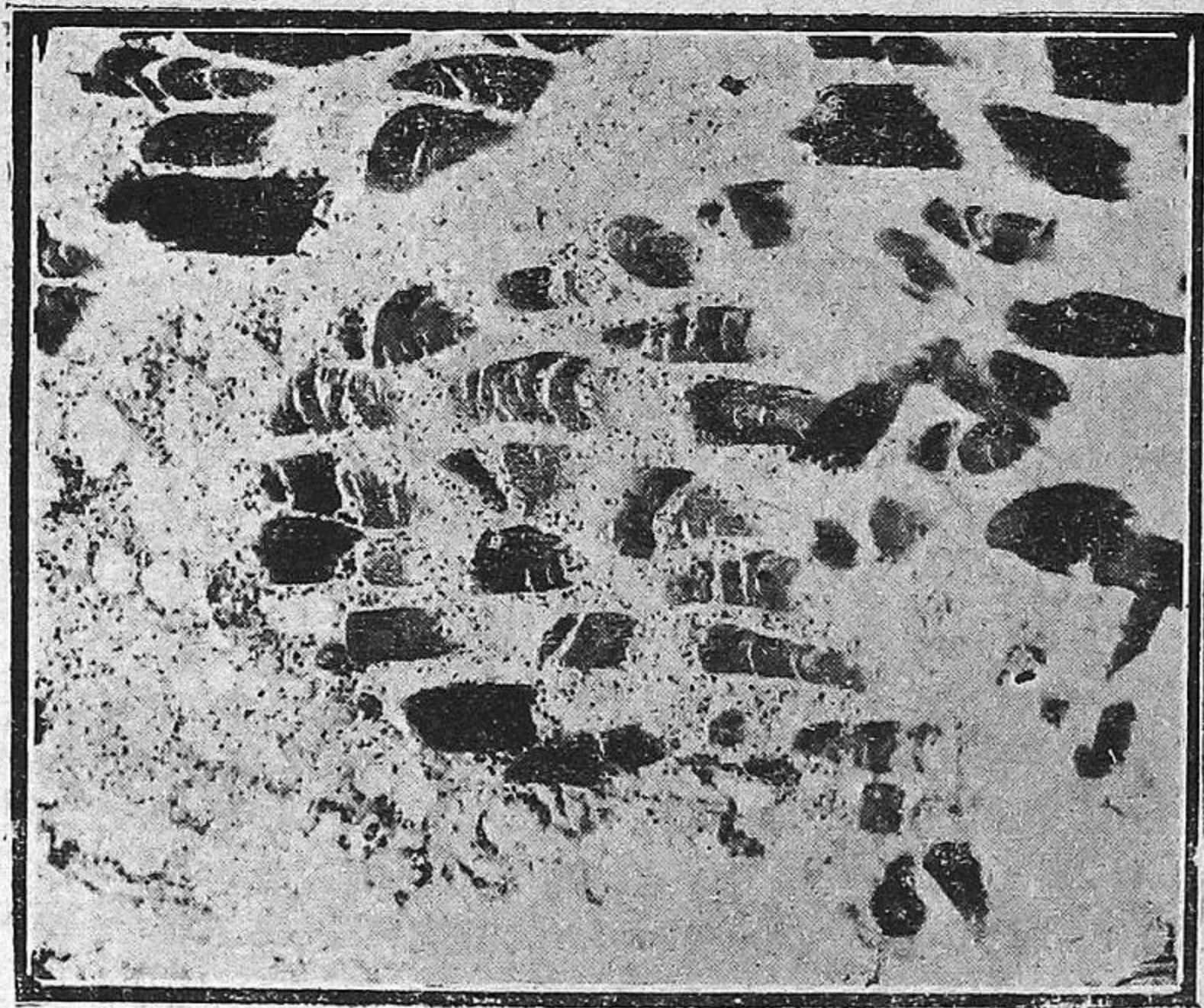
Fig. III.

Muscoli della coscia di cavia, inoculata sottocute con 2 c.c. di brodo coltura di bac. perfringens. Infiltrazione e edema del connettivo inter. e intrafascicolare.

lenticolari, rotondeggianti, bianco-giallastre, a tipo chiuso. Il mezzo nutritivo glucosato viene spezzettato a grossi frammenti, con discreta acqua di condensazione e notevole sviluppo di gas. Nella gelatina lo sviluppo è molto meno vivace, ottenendosi la lenta e non completa fluidificazione di essa. Il siero di bue solidificato non viene attaccato. La pappa di cervello, secondo le indicazioni di v. Hibler, viene acidificata e non annerita. Il latte viene coagulato in 12 - 24 ore, con manifesta acidificazione del mezzo, e formazione di coagulo, cribroso, a guisa di spugna alla superficie del liquido chiaro, che si separa da esso. Fermenta attivamente il glucosio, il lattosio e il maltosio, con sviluppo abbondante di acidi.

L' inoculazione sottocutanea di c. 0,5 dell'essudato, raccolto direttameate dal focolaio settico, in una giovane cavia, condusse a morte l'animale verso la 26ª ora, con formazione di un flemmone gassoso nel punto di inoculazione. Iniettando sottocute o fra i muscoli l' anaerobio isolato, ho potuto riprodurre delle lesioni gangrenose con sviluppo di gas, allorchè adoperavo circa c.c. 2 di brodo cultura di 48 ore. All'autopsia si riscontravano alterazioni necrotiche del sottocutaneo e del tessuto muscolare, che
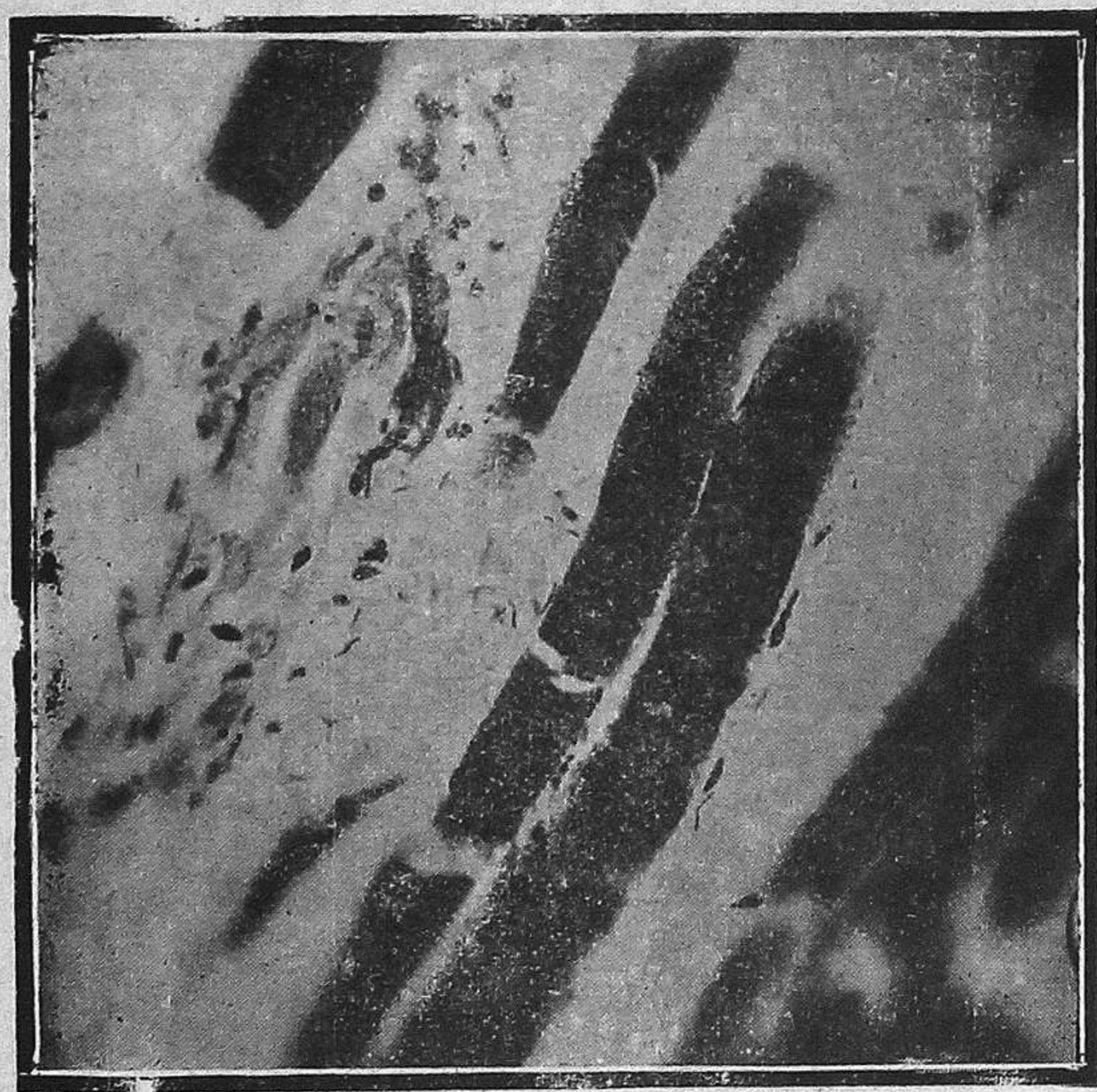
Fig. IV.

Muscoli di coscia di cavia inoculata inframuscolarmente con 2 c.c. di brodo coltura di bac. perfringens. Si iniziano fatti di desintegrazione protoplasmatica. Nuclei picnotici. Presenza di germi nel connettivo interfascicolare.

si presentava rigonfio, rammollito, di color rosso-scuro. Microscopicamente si rileva dissociazione delle singole fibre per edema del connettivo inter-e intrafascicolare (*vedi microfotografia III e IV*) con omogeneizzazione del protoplasma, che si presenta qua e là cosparso di numerose granulazioni e di vacuolizzazioni. In alcuni punti, dove il pro-

cesso è più avanzato, si notano spiccati fatti di miolisi con evidente segmentazione delle singole fibre e consecutiva frammentazione irregolare e parcellare. I nuclei del sarcolemma si mostrano picnotici. Col metodo Gram-Weigert o Ribbert sono evidenti le forme bacillari, che si riscontrano nel connettivo interfascicolare, in mezzo a scarsi leucociti polinucleari, macrofagi ed eosinofili. Identico quadro anatomo-patologico, con più evidenti e manifeste alterazioni necrotiche con sviluppo di gas, si ottiene allorchè l'inoculazione di brodo-cultura del germe anaerobio (anche in dosi minori c.c. 0,75-1) veniva preceduta dall'iniezione intramuscolare di c.c. 0,5 di soluzione di cloruro di calcio al 10 %, che da per sè provoca limitate zone di necrosi. L'inoculazione simultanea del brodo-cultura del germe anaerobio con lo streptococco provoca nel sottocutaneo della cavia un flemmone gassoso. L'azione tossica venne saggiata, iniettando della tossina globale, ottenuta centrifugando e decantando del brodo cultura Tarozzi, che aveva subito per 10 giorni l'azione di una soluzione di tricresol, e che mi si era dimostrata sterile. L'inoculazione endovenosa di c.c. 2 produce la morte nella cavia (di 300 gr.) in circa tre ore, con gravi disturbi respiratori. L'inoculazione sottocutanea dà luogo ad una tumefazione edematosa nel punto di iniezione, senza produzione di gas. Non mi fu possibile, per ragione di tempo e di opportunità, di poter saggiare l'azione del filtrato, come io stesso avevo praticato nelle mie precedenti ricerche.

In base ai caratteri morfologici, culturali e biologici riconobbi, nel germe anaerobico in esame, il *bacillo perfringens o bac. di* Welch-Fränkel, come avevo avuto occasione di riscontrare in altri casi di infezione gassogene, venuti precedentemente alla mia osservazione.

*
* *

OSSERVAZIONE II. — T... Domenico, di a. 31, sold. del 3.° Alpini. Ferito di scheggia da granata il 7 luglio 1916 sul monte Orticara. Fu accolto nel reparto Militare della R. Clinica Chirurgica di Firenze il 21 luglio 1916. Presentava ferita a canale completo al terzo medio della gamba destra con fori d'entrata e di uscita, piccoli, irregolari; da quest' ultimo fuoriusciva della secrezione icorosa, fetida, commista a piccole bolle di gas. La gamba era leggermente tumefatta e lasciava percepire profondamente un senso di crepitazione. Procedutosi ad un generoso sbrigliamento della parte sul lato esterno della gamba destra, si riscontrò integrità del tessuto cellulare sottocutaneo e profonde alterazioni dei muscoli peroneali. Questi si presen-

tavano tumefatti, rammolliti, spappolabili e areati, di colorito rosso verdastro, emananti odore putrido. Dall' essudato e dai pezzi di muscoli delle parti profonde venne coltivato un bacillo anaerobio, mobile, sporigeno, Gram-resistente e putrificante; dalla secrezione, che veniva all'esterno, assieme al sopradetto germe, un «proteus». Eliminati tutti i tessuti gangrenati e putridi; e, dominato il processo gassogeno, mercè irrigazioni abbondanti di acqua ossigenata, si ebbe in poco tempo detersione della

Fig. V.

Muscoli peroneali umani dell'osservazione II. Avanzato processo di desintegrazione delle fibre muscolari. Frammentazione irregolare e parcellare.

ferita e guarigione. L' esame istologico dei pezzi di tessuto muscolare, asportato chirurgicamente, faceva notare gravi alterazioni di esso. In mezzo a fasci di fibre muscolari omogeneizzate, con alterazione delle loro affinità tintoriali, si notavano blocchi di fibre muscolari, come se fossero state dissociate nel senso trasversale, segmentate a guisa di dischi, irregolarmente disposti, che si coloravano bene con l'ematossilina ferrica. In alcuni punti si riscontrava avanzato processo di disintegrazione della fibra, essendo ridotta questa in piccoli frammenti e in detriti non più riconoscibili (Vedi microfotogr. V). I nuclei erano profondamente alterati e in molti punti scom-

parsi. Quà e là erano evidenti fatti di infiltrazione parvicellulare, con presenza di rare forme bacillari.

Ricerche microbiologiche — Dalla secrezione putrida e dai muscoli furono eseguite culture aerobiche e anaerobiche, come nel caso precedente. Nelle aerobiche (solo in quelle allestite dall'essudato, mentre rimasero sterili quelle, in cui furono inseminate dei pezzi di muscoli), si ebbe sviluppo di un germe, che facilmente identificai per un « Proteus vulgaris »; nelle anaerobiche riuscii ad isolare un bacillo, morfologicamente simile al bacillo dell'edema maligno di Koch. Debolmente mobile, presenta per lo più spora rotondeggiante, paraterminale. Nel terreno Tarozzi si sviluppa, intorbidando leggermente il brodo; rammollendo il pezzo di fegato (che diviene verdastro) e emanando odore decisamente putrido. Si ha rigoglioso sviluppo nel brodo glucosato, dove vi sia stato aggiunto un cubetto di uovo solidificato. La pappa di cervello viene alcalinizzata, annerita, con emanazione di gas putridi. Nell'agar glucosato si notano colonie a tipo aperto, per lo più come filamentose o raggiate (*vedi microfotografia* I). L'agar ad alto strato viene frammentato per sviluppo di gas. Nella gelatina a 20° c. sviluppo lento, e fluidificazione del substrato nutritivo. Nel latte si ha produzione di coagulo, a fini grumi, che viene poi in parte digerito. Il bacillo in esame presenta azione abbastanza spiccata sugli zuccheri (glucosio, maltosio, lattosio), debole sul saccarosio, nullo o quasi sull'amido.

L'inoculazione fra i muscoli della radice della coscia della cavia, di c. c. 1,5 di coltura in brodo glucosato di 24-48 ore, ottenuta appena dopo l' isolamento del focolaio settico, diede luogo ad una ben evidente infiltrazione edematosa, ricoperta da cute con aree livide e che presentava poi qualche lesione di continuo, da cui fuoriusciva dell'essudato torbido, leggermente sanguinolento, fortemente putrido, commisto a qualche bolla di gas. L' esito letale si ebbe verso la 48ª ora. Dopo alcuni mesi il germe aveva perduto la sua virulenza, e per ottenere le lesioni sopra registrate, bisognava l' inoculazione di 4-5 c. c. di brodo cultura Martin. In tali casi la morte sopravvenne raramente; per lo più si notò delimitazione del processo settico, con colliquazione limitata dei tessuti, lenta detersione della perdita di sostanza e guarigione. È interessante il reperto avuto, associando l' inoculazione di questo bacillo anaerobio putrificante, divenuto avirulento, alla dose di c.c. 1 di brodo cultura) con c.c. 0,75-1 di bacillo perfringens, isolato nel caso precedente: si ebbe la morte della cavia in 24-36 ore, con lesioni muscolari gangrenose e putride, edema siero-gelatinoso rosso-grigiastro del sot-

tocutaneo e infiltrazione di gas. L' inoculazione simultanea di brodo cultura dei due bacilli, isolati in questo caso dalla secrezione putrida (proteus e bacillo anaerobio, sporigeno, putrificante; rispettivamente alla dose di c.c. 1,5) dà luogo a localizzate e più appariscenti lesioni gangrenose-gassogene, a carattere decisamente putrido. Devo far notare come l' inoculazione di coltura pura dello stipite del bac. proteus isolato dava solo localizzata infiltrazione sottocutanea.

Inoculando fra i muscoli della radice della coscia, verso l' inguine, una dose non patogena del bacillo anaerobio putrificante (c.c. 1-2 di brodo cultura), dopo aver iniettato in loco c. c. 0,5 di una soluzione di cloruro di calcio al 10 $^0/_0$, viene a prodursi una rapida tumefazione, che invade tutta la radice della coscia e spesso il quadrante inferiore dell' addome. La cute presentante qua e là delle chiazze nerastre, come escare, si rompe nella parte necrotica più prominente, spesso verso l' inguine, mettendo in evidenza una escavazione necrotica, a margini scollati, di colorito rosso-scuro, alternata da aree verdastre, con evidente colliquazione del tessuto muscolare, che si presenta scarsamente infiltrato da bollicine di gas. Queste lesioni si estendono con frequenza verso il quadrante inferiore dell'addome, dove si nota distruzione muscolo-aponevrotica della parete addominale fino alla fascia trasversalis, in modo da seguire spesso ernia delle anse intestinali. Verso la radice della coscia si possono riscontrare ampie zone necrotiche, con distruzione delle parti molli, fino a mettere allo scoperto lo scheletro sottostante. I tessuti gangrenati emanano odore nauseante, come di inoltrata putrefazione. Le condizioni generali dell'animale sono discrete; esso si presenta solo abbattuto. Di norma sopravviene lentamente la guarigione; raramente segue esito letale.

Alla biopsia del tessuto muscolare, in preda al processo settico-putrido, si riscontrano pronunziate alterazioni necrobiotiche: le fibre muscolari sono dissociate e omogeneizzate, di aspetto ialino e in alcuni punti cereo. Alcune fibre sono frammentate, ridotte a blocchi informi. É da rilevare le profonde alterazioni nucleari, sotto forma di vacuolizzazioni, cariorexi, e frequentemente distruzione totale dei nuclei. Quà e là si riscontrano fatti di infiltrazione cellulare, costituita da polinucleati, eosinofili e da non rare cellule di natura connettivale. I germi sono riccamente rappresentati, negli spazi interfascicolari, sotto forma di bacilli, per lo più riuniti a gruppi (*vedi microfotografia* VI). Profonde alterazioni litiche, con sviluppo di gas putridi, dissimili quindi ai precedenti, con mancanza di ogni carattere reattivo, ho potuto riprodurre in

vitro col seguente dispositivo (camera umida di P a n e): Adagiavo un pezzo di muscolo di cavia, raccolto asetticamente su un portaoggetti, posto in capsula di P e t r i, dove versavo una piccola quantità di soluzione fisiologica fino ad affiorare il tessuto muscolare. Su questo venivano poste due gocce di brodo-cultura del bacillo anaerobico putrificante, lasciando poi tutto alla temperatura di 37° c.
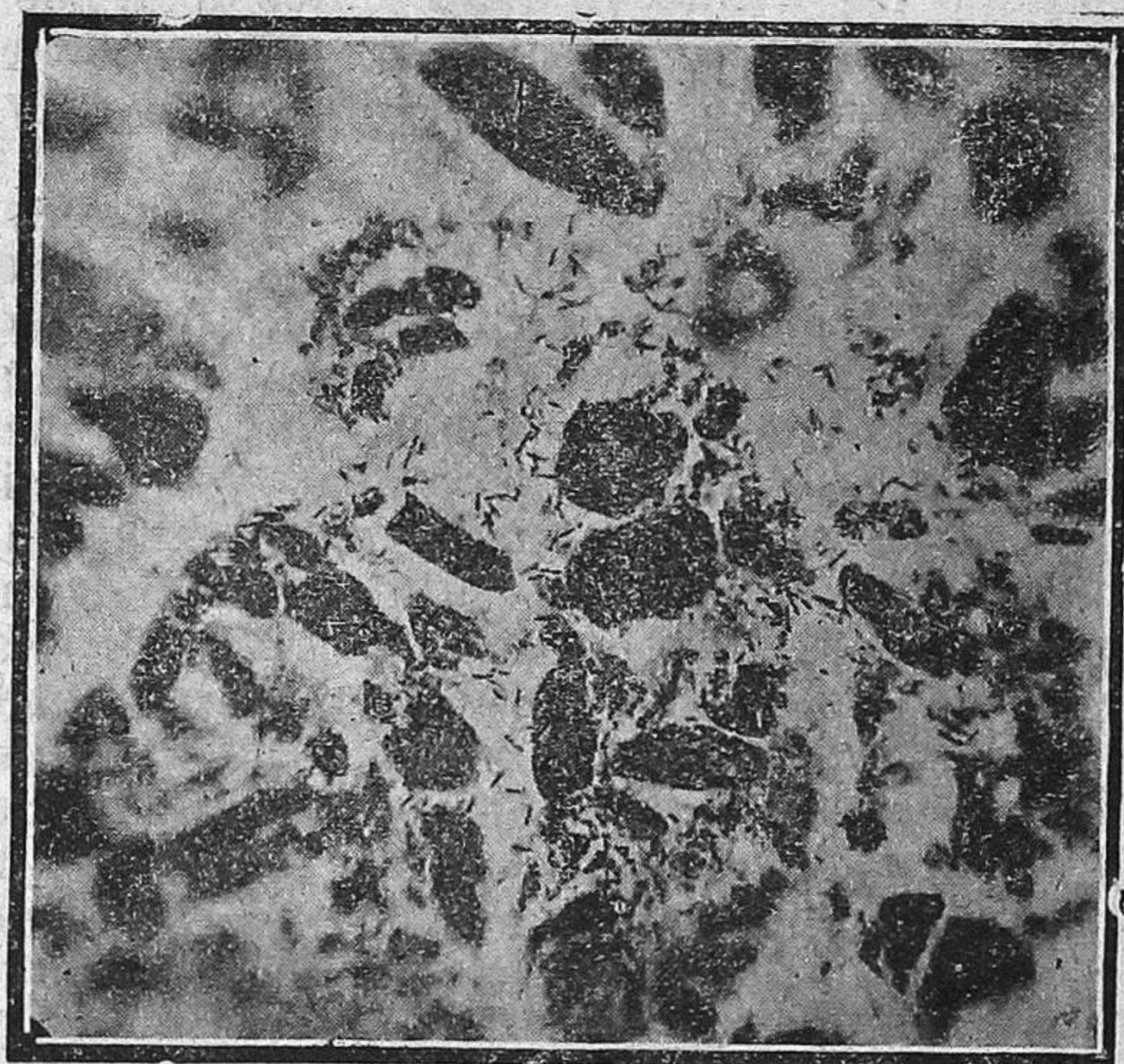
Fig. VI.

Desintegrazione e frammentazione delle fibre muscolari. Presenza di numerosi germi negli spazi interfascicolari. (Inoculazione inframuscolare di c.c. 1,5 di brodo coltura di Bac. sporogenes, previa iniezione di c.c. 0.5 di soluzione di cloruro di calcio al 10 %.

Il tessuto diveniva ben presto molle, come colliquato, di colorito verdastro, presentava reazione alcalina, ed emanava odore fetido, nauseante, spiccatamente ammoniacale.

La cultura in brodo glucosato, centrifugata, per iniezione sottocutanea, alla dose di 4 c. c., provoca infiltrazione edematosa, che ben presto scompare; in vitro manifesta scarsissima azione emolitica sui globuli rossi di cavia e di coniglio.

Per i caratteri surriferiti credetti considerare il bacillo anaerobio putrificante come molto vicino al *Bacillus sporogenes di* M e t c h i k o f f (varietà A), giudizio confermato

dall'esame comparativo con un ceppo di « bac. enteritidis sporogenes » della raccolta dell' Istituto di Batteriologia della R. Università di Napoli, fornitomi gentilmente dal Prof. Pane, che l' ebbe originariamente da Klein. Da questi si allontanava per la maggiore attività fermentativa sugli idrati di carbonio e per il discreto potere patogeno, manifestato nelle cavie, dove — come ho sopra descritto — sono riuscito a riprodurre il quadro anatomo-clinico, riscontrato nell'uomo.

*
* *

OSSERVAZIONE III. — M.... Ettore, di a. 27, sold. del 25.° Fanteria. Fu colpito alle ore 14 del 24 marzo 1917, trovandosi alle esercitazioni al Poligono di Villa Fabris, da scheggia di bomba a mano all'arto inferiore sinistro. Viene accolto nel reparto chirurgico, da me diretto, all' Ospedale Militare T. Salsa di Treviso, dopo 6 ore circa dal traumatismo. Presentava una ferita a fondo cieco al terzo medio, sulla faccia esterna della gamba sinistra, senza apparente lesione dello scheletro. L'arto si presentava in toto tumefatto, di consistenza dura, tendente al ligneo. Non si percepiva la pulsazione della tibiale posteriore, nè della pedidia. La pelle della gamba era fredda, tesa, di colorito biancastro, come di porcellana, mentre quella del piede si presentava di colorito cianotico, con qualche vescicola siero-ematica.

Un bravo sanitario, il tenente medico Dr. Colombino, trovandosi di guardia, credette subito conveniente di sbrigliare largamente il focolaio settico, dando esito ad una grossa scheggia metallica, ad un pezzo di stoffa e a poca quantità di liquido siero-ematico. Dopo circa 12 ore, procedendo alla nuova medicazione, si ebbe a notare tutta la gamba sinistra tumefatta, quasi più del doppio dell'omologa, con senso di crepitazione. Eseguii allora incisioni longitudinali assai profonde, seguendo il decorso dell'aponevrosi, in modo da separare fra di loro i vari gruppi muscolari, che apparivano di colorito rosso-cupo o rameico, con notevole edema siero-emorragico circumambiente. Lo scheletro della gamba non era leso; si riscontrava soltanto in rapporto al tragitto del proiettile, il periostio della faccia antero-esterna della tibia scollato o in alcuni punti necrosato. (Per Perez (100), Dionisi, Forni (101) Canelli (102), fatti gangrenosi di tessuti periostali e paraostali sono frequenti a riscontrarsi in tali infezioni). Con pezzi di tessuto muscolare e dell'essudato siero-ematico si praticano culture aerobiche e anaerobiche. In quest' ultime si ha sviluppo di un germe mobile, sporigeno, gassogeno. L' emo-

cultura rimane negativa. Dopo aver eliminato le parti molli, spappolabili e in avanzato processo gangrenoso, eseguii un imballaggio muscolare, secondo Camera (103), con garza all'acqua ossigenata. Questo veniva rinnovato ogni 12 ore e alternato con impacchi di debole soluzione di ipoclorito. Le condizioni generali andavano sensibilmente migliorando; ma nei giorni successivi si notò estensione del processo alla coscia sinistra. Data la progrediente invasione del processo settico e il responso batteriologico, che aveva messo in evidenza il bacillo dell'edema maligno, dietro parere consultivo col Colon. Rossi e col Cap. Opocher procedetti, il 28 marzo, alla disarticolazione della coscia sinistra, con metodo circolare, senza applicare alcun punto di ravvicinamento. Ad onta dell'estesa demolizione. dopo qualche giorno, il moncone si presentava tumefatto, succoso, di colorito rosso-bruno, leggermente areato. Verso la regione lombo-sacrale si notava qualche striatura brunastra e ampie zone di infiltrazione di color rameico. Le condizioni generali ritornarono gravi: l'infermo presentava la tinta del viso di colorito terreo, occhi infossati, naso affilato, lingua arida, secca; sensorio ottuso. Temperatura 39,2-39-6. Polso filiforme. Respiro frequente superficiale. Urine scarse, con abbondante presenza di albumina. Si ebbe esito letale il 2 aprile.

Ricerche microbiologiche — L'esame microscopico degli strisci, eseguiti con l'essudato siero-ematico, che veniva fuori dagl'interstizi muscolari, metteva in evidenza — in mezzo ad una massa informe, in cui erano riconoscibili delle emazie e rari leucociti — degenerati, delle forme bacillari, ben colorabili, resistenti variamente al Gram, per lo più isolate o disposte a due. Morfologicamente il germe, isolato dalle culture anaerobiche, si presentava come un bacillo mobile, sottile (di circa 3-5 μ per 0,6-0,8 μ), ad estremità nettamente arrotondate, diritto o leggermente ricurvo.

In brodo semplice, con pezzo di fegato, si riscontrano in mezzo alle forme precedenti, altre che presentano complesso pleomorfismo, cioè a fuso, a navetta, a barilotto. E' evidente in alcuni preparati la presenza di una spora nella sua parte centrale. Il bacillo è Gram - resistente.

Nel brodo - cultura Tarozzi, glucosata all'1,5 $^0/_0$, si ha dapprima intorbidamento con formazione di schiuma e sviluppo di gas, che emana odore butirrico; verso il 3.° giorno rischiaramento del mezzo nutritivo e formazione di deposito fioccoso. Nel brodo-amido, secondo Pane-Lorenti o nel brodo pancreatina, sec. Sinigaglia, si ha rigoglioso sviluppo. Nell'agar glucosato: colonie aperte, a tipo filamentoso. L'agar ad alto strato viene frammentato

per sviluppo di gas, e modica formazione di acqua di condensazione. Nella pappa al cervello (secondo v. Hibler), si ha acidificazione del mezzo, senza annerimento. La gelatina glucosata viene lentamente fluidificata. Il siero di bue coagulato non viene attaccato. Nel latte si ha formazione di coagulo fioccoso, con acidificazione del mezzo e abbondante sporificazione. Il germe, isolato a Treviso, il 26 marzo 1917, fu studiato dal lato biologico nel giugno dello stesso anno nella R. Clinica Chirurgica di Firenze, dove avevo compiuto le ricerche delle osservazioni cliniche precedenti.

Al Prof. E. Burci, direttore della Clinica, che ha messo a mia disposizione il materiale di studio e mi è stato largo di valevoli ammaestramenti, vadano i sensi del mio animo grato.

L' inoculazione sottocutanea di c.c. 0,30-0,50 di brodo cultura di 48 ore, in cavia di circa 350 gr., riuscì mortale entro la 24.ª ora, con fenomeni irritativi manifesti nel primo periodo, a cui seguiva paresi del treno posteriore, disturbi respiratori e accentuata ipotermia. Localmente si nota la comparsa di una tumefazione edematosa, a carattere siero-emorragico, con scarsa presenza di gas, che tende a diffondersi nel sottocutaneo dell' addome. I muscoli della regione iniettata si presentano arrossiti, non rammolliti, ma imbibiti di siero sanguinolento. Anche le aponevrosi si trovano in preda a rigonfiamento edematoso. Nella cavità peritoneale esiste discreta quantità di liquido ematico. La milza è ingrandita, spappolabile, di colorito rosso scuro. Sulla superficie di essa e dei visceri addominali si rileva il germe sotto forma di lunghi filamenti. L'emocultura, col sangue del cuore, eseguita verso la 18.ª ora, riesce positiva. La cultura centrifugata, (c.c. 2-3) per via sottocutanea provoca in loco infiltrazione edematosa, a cui può seguire dopo alcuni giorni morte dell'animale in profonda cachessia; in vitro manifesta spiccato potere emolitico sui globuli rossi di cavia e di coniglio.

Per il complesso dei caratteri microbiologici surriferiti mi credetti autorizzato ad identificare il germe in esame al vibrione settico di Pasteur, o al bacillo dell'edema maligno nel senso di Ghon e Sachs, come io stesso potei controllare con un ceppo di vibrione settico, cortesemente fornitomi dal Prof. Pane di Napoli e da lui isolato, circa 16 anni fa, da un infezione edemo-flemmonosa.

***

Riassumendo, per ordine cronologico, i reperti registrati nei tre casi descritti di infezioni gassogene per ferite di guerra, e nei quattro casi, resi di pubblica ragione nel 1909 e nel 1910, di infezioni gassogene nella pratica civile, avremo i seguenti dati :

Num. d'ordine e data	Tipo della lesione	Forma anatomo-clinica dell' infezione gassogena	Reperto micro-biologico	Esito
I. 21-XII-1917	Ferita alla radice della coscia sinistra per ferita d'arma da fuoco.	Necrobiosi gassosa putrida circoscritta.	Proteus vulgaris Hauseri, e Proteus Zenkeri.	Guarigione
II. 28-XII-1908	Gravi lesioni traumatiche delle parti molli all'arto inferiore sinistro (contusioni, escoriazioni multiple e ferite da pestamento, prodotte durante il terremoto Calabro-siculo).	Gangrena gassosa, leggermente putrida, a forma diffusa.	Bac. perfringens, streptococcus piogenes, Proteus vulgaris.	Esito letale in 5.ª giornata.
III. 28-XII-1908	Gravi lesioni traumatiche delle parti molli alla gamba sinistra (c.s.).	Flemmone gassoso, a tipo infiltrante.	Bact. coli (var. bac. lactis aërogenes). Streptococcus piogenes.	Guarigione
IV. 28-XII-1908	Gravi lesioni traumatiche delle parti molli alla gamba destra (c.s.).	Flemmone gassoso, a forma polisegmentaria.	Bac. perfringens, Bac. pseudo-diphtericus, Staphilococcus piog. aureus.	Esito letale, dopo circa un mese, per complic. cardio-renali
V. 7-VIII-1915	Frattura esposta del femore sinistro, per scheggia di granata.	Edema gassoso, a carattere flemmonoso.	Bac. perfringens, streptococcus piogenes.	Guarigione
VI. 7-VII-1916	Ferita alla gamba destra, con spappolamento delle parti molli per scheggia di granata.	Necrobiosi gassosa putrida circoscritta.	Bac. sporogenes, Bac. proteus Hauseri.	Guarigione
VII. 24-III-1917	Ferita alla gamba sinistra, per scheggie di bomba a mano.	Edema gassoso, a forma massiva.	Bac. Oedematis maligni Koch-Gaffky (sec. Ghon e Sachs).	Esito letale in 9.ª giornata.

In sette casi abbiamo dunque riscontrato sei volte il reperto di una flora polimicrobica, per lo più aero-anaerobica, una sola volta anaerobica pura. Tali germi possono essere riportati a bacilli, appartenenti al gruppo dell'edema maligno, al gruppo del perfringens o a quello dei putrificanti; essi si mostrano, tanto nell'uomo che negli animali da esperimento, dotati di diverso potere patogeno, che va da un massimo per i bacilli del gruppo dell' edema maligno ad un minimo per quelli appartenenti al gruppo dei putrificanti. Il gruppo del bac. perfringens racchiude ceppi dotati di incostante e variabile capacità patogenetica; si trovano fra questi non raramente stipiti, che iniettati in tessuti sani e in cultura pura, sono incapaci di esercitare azione patogena di qualche importanza. Con tali ceppi avirulenti si è nondimeno, in alcuni casi, riusciti a riprodurre il quadro dell' infezione gassogena, allorchè tali germi venivano iniettati in tessuti, più o meno profondamente lesi nella loro vitalità. Tale constatazione, fatta anche per altri germi, appartenenti al gruppo dei putrefacenti, mentre da una parte ci mostra l'importanza dottrinale delle alterazioni necrotiche dei tessuti, quale coefficiente favorevole per il determinarsi dell'infezione, dall'altra ci addita nella pratica chirurgica l'exeresi precoce dei tessuti alterati, quale un buon mezzo per prevenire, o per dominare nella fase iniziale, l'infezione gassogena.

Nel caso quinto (osservazione seconda, riportata in questa nota) si ebbe quale complicazione durante il decorso della infezione gassogena, una streptococciemia. Questo fatto deve essere tenuto presente, poichè rappresenta una grave e non rara complicazione, che può accompagnare o seguire il processo settico gassogeno, e su cui hanno creduto insistere anche recentissimamente Lardennois e Baumel (104).

Dal complesso dei fatti riferiti nei precedenti capitoli si rileva come sia erroneo il concetto, che ad un dato quadro anatomo-clinico debba corrispondere una determinata unità batteriologica. La clinica e l' esperimento ci ammaestrano come uno stesso germe sia capace di provocare, in determinate condizioni, quadri clinici differenti e una scala di lesioni e di sintomi variabili.

Nelle nostre osservazioni si ebbero due esiti letali, a rapida evoluzione, nel primo dei quali (caso N. VII°) fu riscontrato da solo il vibrione settico; e nel secondo caso (N. II°) il bacillo perfringens, associato allo streptococco e al proteo. In questi due casi i germi anaerobi, isolati dal focolaio settico gassogeno, si mostrarono dotati di notevole patogenicità per gli animali da esperimento. Esito costantemente favorevole è stato registrato, allor-

chè la flora dell' infezione gassogena era rappresentata da soli aerobi o anaerobi del gruppo dei putrificanti. In tali casi l'infezione è stata facilmente dominata con economici interventi operatori.

Tali dati di fatto vanno di accordo con quelli comunicati dalla maggioranza degli autori, che si sono occupati dell' argomento, e che hanno voluto far risaltare una certa corrispondenza tra evoluzione clinica del processo morboso e reperto microbiologico. Questo assume nella pratica valore indiscusso in rapporto alla prognosi, in quanto che fornisce al chirurgo delle sicure indicazioni per un immediato e appropriato trattamento sierologico e operativo.

LAVORI CITATI.

1. *D'Agata G.* — Centralblatt f. Bakt. ecc. I Abt. Orig. Bd. 54. 1910. Gazzetta intern. di med. e chirur. N. 45. 1910.
2. *Chalier A.* et *I.* — La gangrène gazeuse. F. Alcan. Edit. Paris 1917.
3. *Bingold* — Deutsche med. Wochenschr. N. 23. 1917.
4. *Hitschmann u. Lindenthal* — Wien. Klin. Wochenschr. N. 46. 190J.
5. *v. Werdt* — « Der Gasbrand und seine Erreger » in Handbuch der pathog. Mikroorg. von Kolle u. v. Wassermann. Bd. IV. Iena 1912.
6. *Tiberti* — « La gangrena gassosa » nel Trattato di Parassitologia di A. Lustig. Vol. II. 1915.
7. *Aschoff* — Deutsche med. Wochenschr. N. 47. 1917.
8. *Klose* — Mediz. Klin. Bd. XIV. 1918.
9. *Kolle, Sachs, u. Georgi* — Deutsche med. Woch. 1918.
10. *Pfeiffer u. Bessau* — Deutsche med. Wocheschr N. 39-41. 1917.
11. *Mc. Intosch* — « Medical Research Comittee » London, Spocial Report. N. 12. 1917.
12. *Henry H.* — The Jour. of Pathol. a. Bacter. Vol. XXI. N. 3. 1917.
13. *Adamson R. S.* — The Iournal of Pathol. a. Bact. Vol. XXXII. N. 3-4. 1919.
14. *Weinberg* et *Séguin* — La gangrène gazeuse. Masson et C. Edit. Paris 1918.
15. *Sacquépée* — Présse medicale. 1916.
16. *Fasiani* — Archivio ital. di chirurgia Fasc. I. 1919.
17. *Fiori P.* — Arch. ital. di chir. Vol. I. Fasc. IV. 1920.
18. *Aperlo* — La gangrena gassosa o enfisematica. L. Cappelli. Edit. Bologna 1918.
19. *Pasteur* — Bull. de l' Académ. de Médec.—séance juillet 1877 - fèvr. 1881.
20. *Koch R.* — Mitteil. a. d. kais. Gesundheitsamte in Berlin. Bd. I. 1881.
21. *Gaffky* — Mitteil. a. d. kais. Ges. Amt. Bd. I. 1881.
22. *Brieger u. Ehrlich* — Berlin. klin. Wochenschrift. Bd. XXXIV. 1882.
23. *Chaveau* et *Arloing* — Bull. de l' Académ. de Médec. sèance 6 mai 1884.
24. *Rosenbach* — Monogr. des microbes des malad. infect. des plaies. 1884.
25. *Ghon u. Sachs* — Centralblatt. f. Bakt. etc. I Abt. Orig. Bd. XXXIV - XXXVI. 1903-04.

26. *v. Hibler* — Untersuchungen ueber die pathogenen anaëroben. G. Fischer. Iena 1908.
27. *Fasiani* — Lo sperimentale. Fasc. I-II 1918 (p. 54-55).
28. *Capone* — Atti R. Accad. dei Fisiocritici di Siena. Marzo 1920.
29. *Fränkel E. u. Zeissler* — München. mediz. Wochenschr. N. 5. 1919.
30. — " Med. Research. Comittee ,, Report. sept. 1919.
31. *Wilson I.* — The Lancet. Avril 1919.
32. *Novy* — Zeitschr. f. Hygien. Bd. XVII. 1894.
33. *Migula* — System der Bakterien. G. Fischer verlag. Iena. 1900.
34. *Kerry* — Oesterr. Zeitschr. f. wissensch. Veterinär. Bd. V. Hf. 2. 1894.
35. *Macé E.* — Traité pratique de Bactériologie. Baillière edit. Paris 1913.
36. *Weinberg* et *Séguin* — C. R. de la Soc. de Biologie. N. 10-15. 1915.
37. *Sacquépée* — C. R. de la Soc. de Biologie. N. 11-16-18 1915 e N. 3. 1916.
38. *Veillon* et *Loiseau* — Rapport comm. par Weinberg. C. R. Soc. de Biologie. N. 5. 1916.
39. *Aschoff L.* — Vereinigung der Kriegsärztlich besch. Aerzte Strasburg. 23 nov. 1915.
40. » — Deutsche med. Wochenschrift, N. 47. 1917.
41. *Achalme* — C. R. de la Soc. de Biologie. 25 juillet 1891 Annales de l'Instit. Pasteur 1897.
42. *Welch a. Nuttall* — Bullett. Iohn Hopkins Hospital. Vol. III. 1892.
43. *Fränkel Eugen* — Centralb. f. Bakt. etc. Orig. Bd.XIII 1893. « Ueber Gasphlegmone » Hamburg u. Leipzig 1893.
44. *Veillon* et *Zuber* — Archiv. de médec. expér. et d'Anat. pathol. N. 4. 1898.
45. *Cesaris De Mel* — Giornale Accademia di Medicina di Torino 1898.
46. *Muscatello* e *Gangitano* — La riforma medica N. 190, 1898.
47. *Welch* — Bullett. Iohn Hopkins Hospital. Vol. XI, 1900.
48. *Simonds* — Monogr. of the Rockefeller Institute med. Research. N. 5, 1915.
49. *Muscatello* e *Gangitano* — Rif. medica N. 118-120, 1900.
50. *Vincent* et *Stodel* — C. R. de l'Académ. des Sciences 1917.
51. *Viscontini* — La Gangrena gassosa. Gozzano 1918.
52. *De Kruif a. Bollmann* — Iourn. of. infect. Diseas. J. XXI, N. 6, 1917.
53. *Bullock a. Cramer* — Proceed. Royal Soc. B. J. XC. 1919; res. Bull. Inst. Pasteur N. 13, 1919.
54. *Lardennois* et *Baumel* — Presse méd. N. 63, 1916.
55. *Lévy*, *Fourcade* et *Bollack* — C. R. de la Soc. Biologie. N. 10, 1915.

56. *Westenhoeffer* — Sitzungsber d. k. Akad. d. Wissensch. math-naturwissensch. Kl. III. Abt. 1899.
57. *Kolle, Ritz u. Schlossberger*—Med. Klin. Bd. XIV, 1918.
58. *Taylor* — Archiv. de mé lec. et de pharm. milit. J. LXV. N. 6, 1916.
59. *Picchi* — La Sperimentale, Fasc. I-II, 1907.
60. *Bull a. Pritchett* — Iournal of. exper. medic. T. XXVI N. 1, 1917.
61. *Weinberg* et *Séguin* — C. R. de la Soc, de Biologie N. 10-19, 1915.
62. *v. Hibler* — Centralblatt. f. Bakt. etc. Bd. XXV, 1899.
63. *Stolz* — Beiträge z. Klin. Chirurgie. Bd. XXXIII, 1902.
64. *Costa* et *Troisier* — C. R. de la Soc. de Biol. N. 14, 1915.
65. *Conradi u. Bieling* — Münch. Mediz. Wochenschrift. 1916. Berlin Klin. Wochenschr. N. 19, 1917.
66. *Fasiani* — Lo sperimentale. Fasc. V-VI, 1919.
67. *Bienstock* — Zeitschrift f. Klin. Medizin. Bd. VIII. Hf. I, 1884.
68. *Klein* — Centralblatt f. Bakt. etc. Bd. XXV, 1899.
69. *Rocchi* — Bullett. Scienz. mediche di Bologna. Vol. VIII, 1908. Sperimentale fasc. 2, 1911.
70. *Metchnikoff* — Annales de l'Inst. Pasteur. N. 12, 1908.
71. *Klein E.*—Centrabl. f. Bakter. etc. Orig. Bd. XVIII, 1895.
72. *Weinberg* et *Séguin* — C. R. de la Soc. de Biologie. N. 12-20, 1916.
73. » » — C. R. des séances de l'Académ. des Sciences. Oct. 1916. C. R. de la Soc. de Biologie. N. 3, 1917.
74. *Legros* et *Vaucher*—C. R. de la Soc. de Biol. N 2, 1918.
75. *Ramalhao* — Revista de semiotica laboratorial. T. I. fasc. I-II, 1918.
76 *Weinberg* et *Séguin* — C. R. Soc. Biologie. Sèance du 5 février, 1916.
77. *Wicklein* — Virchow's Archiv. Bd. CLXXV, 1891.
78. *Klose* — Zeitschrift f. Hygien. Vol. 85, 1917.
79. *Escherich* — Fortschr. d. Med. Bd, III, N. 16-17, 1885.
80. *Klein E.* — Centralb. für Bakter. etc. Bd. X, 1891.
81. *Sanfelice* — Annali Istit. Igiene sperim. di Roma. Nuova serie. Vol. I, 1891.
82. *Chavigny* — Annal. de l'Inst. Pasteur. N. 11, 1897.
83. *Welch* — Philadelphia med. Iourn. Vol. VI, 1900,
84. *Uffenheimer* — Ziegler's Beiträge. Bd. XXXI, 1902.
85. *Schupfer F.* — Policlinico. Sezione medica. Anno XII, fasc. 6, 1905.
86. *Legros* et *Lecéne* — C. R. de la Soc. de Biol. N. 22, 1901.
87. *Iacobelli* — Riforma medica. N. 11, 1904.
88. *Anzilotti* — La Clinica Chirurgica. N. 11, 1906.
89. *De Gaetano* — Il Tommasi. Sett. 1906.
90. *Hauser* — Ueber Faülnis bakterien. Leipzig 1885.

91. *Grassberger* — Iahrb. d. Wiener Kranken.—anstalten, Bd. V, 1893.
92. *Sacquépée* — C. R. de la Société de Biol. N. 10, 1918.
93. *Lannerongue* et *Achard* — C. R. de l'Académie de Sciences Paris. N. 14, 1896.
94. *D'Agata* — Il Tommasi. N. 6, 1909.
95. *Sacquépée*, *De Lavergne* et *Dehorne* — C. R. de la Soc. de Biologie, séance du 9 nov. 1918.
96. *Monti A.* — Atti R. Accad. dei Lincei. Vol. V, 1889.
97. *Tissier* — Annales de l'Inst. Pastour, 1916.
98. *Margouliès-Aitoff* et *Braïlowsky* — Rousski wratch. 30 avril 1916, ref. Bull. Instit. Pasteur. T. XIV, 1916,
99. *Pane N.* — Atti R. Accademia Medico-Chirurgica di Napoli, 1919.
100. *Perez* — Conversazioni castrensi milanesi. Ref. nella Clinica Chirurgica. N. 10, 1915. Policlinico, sezione pratica fasc. 3-8, 1915.
101. *Dionisi* e *Forni* — Resoconto delle autopsie eseguite durante il corso di Anat. patologica. Città di Castello. Tip. Leonardo da Vinci, 1917.
102. *Canelli* — Pathologica. N. 3, 1917.
103. *Camera* — La Clinica Chirurgica. N. 2, 1916. Giorn. di med. militare. Genn. 1916.
104. *Lardennois* et *Baumel* — Les infections gangréneuses etc. Masson et C. Edit. Paris, 1920.